

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40	A1	(11) 国際公開番号 WO00/50611
		(43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04634	(81) 指定国 CA, JP, US
(22) 国際出願日 1999年8月27日(27.08.99)	添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平11/47035 1999年2月24日(24.02.99) JP	
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 Osaka, (JP)	
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 阪口 雄雄(SAKAGUCHI, Nobuo)[JP/JP] 桑原一彦(KUWAHARA, Kazuhiko)[JP/JP] 〒860-0811 熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学医学部免疫学講座内 Kumamoto, (JP)	
(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)	

(54) Title: GANP PROTEINS

(54) 発明の名称 GANP蛋白質

(57) Abstract

Novel proteins having a kinase activity and genes encoding these proteins. Namely, GANP proteins specified by the amino acid sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3 in Sequence Listing each participating in signal conversion of abnormal B cell differentiation in the autoimmune state and having a kinase activity; and polynucleotides encoding the same.

(57)要約

本発明の目的は、キナーゼ活性を有する新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子を提供することである。本発明によれば、配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列により特定され、自己免疫状態において異常B細胞分化のシグナル変換に関与し、キナーゼ活性を有するGANP蛋白質、及び該蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E アラブ首長国連邦	D M ドミニカ	K Z カザフスタン	R U ロシア
A G アンティグア・バーブーダ	D Z アルジェリア	L C セントルシア	S D スーダン
A L アルバニア	E E エストニア	L I リヒテンシュタイン	S E スウェーデン
A M アルメニア	E S スペイン	L K スリ・ランカ	S G シンガポール
A T オーストリア	F I フィンランド	L R リベリア	S I スロヴェニア
A U オーストラリア	F R フランス	L S レソト	S K スロヴァキア
A Z アゼルバイジャン	G A ガボン	L T リトアニア	S L シエラ・レオネ
B A ポズニア・ヘルツェゴビナ	G B 英国	L U V ルクセンブルグ	S N セネガル
B B バルバドス	G D グレナダ	L V ラトヴィア	S Z スウェーデン
B E ベルギー	G E グルジア	M A モロッコ	T D チャード
B F ブルガリア・ファン	G H ガーナ	M C モナコ	T G トーゴー
B G ブルガリア	G M ガンビア	M D モルドヴァ	T J タジキスタン
B J ベナン	G N ギニア	M G マダガスカル	T M トルクメニスタン
B R ブラジル	G R ギリシャ	M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R トルコ
B Y ベラルーシ	G W ギニア・ビサオ	共和国	T T トリニダッド・トバゴ
C A カナダ	H R クロアチア	M L マリ	T Z タンザニア
C F 中央アフリカ	H U ハンガリー	M N モンゴル	U A ウクライナ
C G コンゴー	I D インドネシア	M R モーリタニア	U G ウガンダ
C H スイス	I E アイルランド	M W マラウイ	U S 米国
C I コートジボアール	I L イスラエル	M X メキシコ	U Z ウズベキスタン
C M カメルーン	I N インド	M Z モザンビーク	V N ベトナム
C N 中国	I S アイスランド	N E ニジエール	Y U ユーゴースラヴィア
C R コスタ・リカ	I T イタリア	N L オランダ	Z A 南アフリカ共和国
C U キューバ	J P 日本	N O ノールウェー	Z W ジンバブエ
C Y キプロス	K E ケニア	N Z ニュージーランド	
C Z チェコ	K G キルギスタン	P L ポーランド	
D E ドイツ	K P 北朝鮮	P T ボルトガル	
D K デンマーク	K R 韓国	R O ルーマニア	

明 細 書

G A N P 蛋白質

技術分野

本発明は、キナーゼ活性を有する新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

背景技術

末梢リンパ系組織(*peripheral lymphoid organs*)の抗原特異性B細胞の活性化及び成熟は膜IgRに結合する抗原により開始される(Rajewsky, *Nature (Lond.)*, 381:751-758, 1996; Sakaguchi et al., *Adv. Immunol.* 54:337-392, 1993)。B細胞は免疫後48時間以内に動脈周囲リンパ鞘(PALS)(Rajewsky, *Nature (Lond.)*, 381:751-758, 1996)の外側に入り、特異的Th細胞との共同刺激に依存性の相互作用及び樹状細胞の指状突起会合を開始する(MacLennan, *Annu. Rev. Immunol.*, 12:117-139, 1994; Liu et al., *Immunol. Rev.*, 156:111-126, 1997)。抗原に誘導されたB細胞はPALSの外側で増殖し、次にリンパ濾胞でさらに活性化され、胚中心(以下、本明細書において「GC」と略す場合がある。)が確立される(Han et al., *J. Immunol.*, 155:556-567, 1995; Jacob et al., *J. Exp. Med.*, 176:679-687, 1992; Kelsoe, *Immunity*, 4:107-111, 1996)。このB細胞は成熟して、細胞周期の間に迅速に動き回って暗領域を形成する大型のslg⁻セントロblast(中心芽細胞)となり、さらに成熟して表面の独特な特徴であるPNA⁺B220⁺slgM⁺slgD⁻CD38⁺をGCの明領域に発現するセントロサイト(中心細胞)となる(Kosco-Vilbois et al., *Immunol. Today*, 18:225-230, 1997; Kelsoe, *Immunol. Today*, 16:324-326, 1995; Oliver et al., *J. Immunol.*, 158:1108-1115, 1997)。セントロサイトはおそらくアボトーシス又は免疫グロブリンV領域の親和性成熟のいずれかの過程と、IgGクラス抗原へのクラススイッチの変化過程とを受け

ているが、一部のセントロサイトは記憶B細胞としてリンパ様画分中に長期間生存するようになる。その他のセントロサイトはおそらくGCの周辺帯に遊走し、さらなる抗原刺激と、CD40やCD38などのB細胞活性化分子及び種々のB細胞刺激性サイトカインのレセプターを経る共同刺激シグナルとを受ける(Gray et al., J. Exp. Med., 180:141-155, 1994; Foy et al., J. Exp. Med., 180:157-163, 1994)。この領域でさらに刺激される抗原特異性B細胞は、おそらく、様々な他の免疫担当細胞が抗原誘導B細胞と相互作用する可能性がある脾臓の間質性領域(赤脾臓と呼ばれる。)内に遊走する。数種の自己免疫マウスの組織化学的分析によって、形質細胞として、又はモット細胞(Mott cells)と呼ばれる異常型の形質細胞として現れるこの領域に独特の抗体産生細胞が同定された(Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)。

自己免疫は、自己／非自己の識別障害が抗原特異性リンパ球において頻繁に起こる現象である(Theofilopoulos, Immunol. Today, 16:90-98, 1995)。種々の自己免疫疾患の免疫系において、T細胞及びB細胞に関する複合的なメカニズムが認められる(Theofilopoulos et al., Adv. Immunol., 37:269-290, 1985; Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992; Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996; Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981; Watanabe-Fukunaga et al., Nature (Lond.), 356:314-317, 1992; Takahashi et al., Cell, 76:969-976, 1994; Shlomchik et al., Nature (Lond.), 328:805-811, 1987)。

NZB系及びNZW系は、(NZB x NZW)F₁系マウスとして、重篤な自己免疫状態であるSLEを引き起こす多数の遺伝的因子によって特徴づけられている(Theofilopoulos et al., Adv. Immunol., 37:269-290, 1985; Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992; Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996; Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981)。NZB系マウスでは、自己免疫性溶血性貧血を引き起こす抗赤血球抗体によって、自己免疫状態が自然発的に形成され(Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992)、

NZW 系マウスは潜行性の自己免疫現象を示す (Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996)。(NZB x NZW)F₁ 系マウスの SLE 状態は、明らかに T 細胞及び B 細胞に関連する多数の遺伝的因子によって引き起こされている (Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981)。NZB 系マウスは B 細胞の明らかな異常を示すが、NZB 系マウスにおける異常 B 細胞活性化の分子的メカニズムは解明されていない。

発明の開示

このような B 細胞の成熟に関連する分子の問題を検討するため、本発明者らはマウスの B 細胞系統である WEHI-231 系の細胞内成分に対するモノクローナル抗体を作製した。この細胞系は NZB 系の遺伝的背景を有しており、29-15 と命名したモノクローナル抗体は、末梢リンパ系組織の GC-B 細胞で発現が増強される分化抗原を認識するものである。この 29-15 モノクローナル抗体を用いて、本発明者らは末梢リンパ系組織における抗原の発現を検討したところ、この抗原は高免疫マウスの GC の明領域で増強される分化抗原として特徴づけられた。NZB 系マウスの脾臓では、GANP 抗原を高度に発現する IgM 産生形質細胞が自己免疫の開始以前に現れるが、この発現が末梢免疫応答及び自己抗体による自己免疫を理解するために重要な分子挙動であることが示唆された。

本発明者らは、胚中心のセントロサイトで選択的に発現が増強される上記抗原を確認すべく研究を行ない、単離した cDNA プローブ (ganp プローブ) を用いたイン・サイチュ (*in situ*) RNA ハイブリダイゼーションによって、29-15 モノクローナル抗体で染色される領域において ganp mRNA の発現が増加することを確認した。また、その遺伝子産物である GANP 蛋白質が細胞質及び核内に局在する 210kD の蛋白質であり、酵母の転写調節遺伝子 SAC3 と構造的に類似することを確認した。抗 IgM 抗体及び抗 CD40 抗体で B 細胞を活性化したところ、GANP 蛋白質に結合してくるキナーゼの量が増加した。これらの結果から、GANP 蛋白質は、ある自己免疫状態において異常 B 細胞分化のシグナル変換に関与する可能性があることが示

唆された。本発明はこれらの知見を基にして完成された。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列により特定される GANP 蛋白質を提供するものである。本発明により、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、一又は複数のアミノ酸が欠失し、一又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、及び／又は一又は複数の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GANP 蛋白質と同質のキナーゼ活性を有する GANP 変異蛋白質が提供される。本発明により、上記 GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチドが提供される。

別の観点からは、本発明により、前記の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。代表的なポリヌクレオチドは哺乳類動物由来の GANP 蛋白質をコードする DNA であり、それらのうち、哺乳類動物が有する遺伝子 DNA が好ましい。最も好ましいポリヌクレオチドの例は、配列表の配列番号 2 (マウス由来の GANP 蛋白質をコードする DNA 配列) または配列番号 4 (ヒト由来の GANP 蛋白質をコードする DNA 配列) に記載された塩基配列により特定される。

また、本発明により、前記ポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド又は該アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体が提供される。さらに、本発明により、前記ポリヌクレチドチド又は前記アンチセンスポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 12 以上の塩基からなるポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド又は前記アンチセンスポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。

さらに別の観点から、本発明により、配列表の配列番号 2 または配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA あるいは他の哺乳類動物由来のホモログである DNA を取得する方法であって、前記のポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドをプローブとして、哺乳類動物の cDNA ライブラリーから該プローブとハイ

プリダイズする cDNA を取得する方法が提供される。該 cDNA の長さは GANP 遺伝子とほぼ同じ長さであり、それがコードする蛋白質は約 210kDa 程度である。また、本発明により、前記の方法により得られた cDNA 及びそれがコードする GANP 蛋白質が提供される。

本発明の別の観点からは、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識する抗体が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、正常マウスの PP における 29-15⁺細胞の検出を示した写真である。29-15 mAb 及び ALP 抗ラット Ig 抗体を用いて、PP について免疫組織化学的分析を実施した。陽性細胞は、ベクターブルー-ALP 基質を有する中央領域に出現し、非特異的内在性 ALP 活性を含む小腸絨毛では、周辺領域に強いシグナルが認められた。二色染色を行うために、切片はビオチン抗 B220 mAb 又はビオチン抗 IgD mAb のいずれかでさらに染色し、DAB 及び HRP-ストレプトアビシンによって発色させた。

図 2 は、SRBC 免疫化マウスの GC 領域における 29-15⁺細胞の出現を示した写真である。正常 BALB/c 系マウスは、12 日間に 4 回 SRBC を注射し、脾臓切片をヘマトキシリンで染色するか、図 1 と同様な免疫組織化学染色で調べた。29-15 mAb で染色した後に比較すると、正常及び SRBC 免疫化 BALB/c 系マウスの切片は類似していた。

図 3 は、SRBC 免疫化マウスの GC 領域における 29-15⁺細胞の出現を示した写真である。GC 領域の切片を「材料と方法」に記載した個々の色と組み合わせて PNA、抗 BrdU 及び 29-15 mAb で染色した。上段の写真は GC 領域 (GC) 及び中心溝動脈 (CA) のヘマトキシリン染色を示し、中央の写真は 29-15⁺PNA⁺細胞を指す三色染色を示す。下段は 29-15⁺PNA⁺細胞を図解したものである。

図 4 は、自己免疫傾向マウスの赤脾髄領域における GANP^{dense}⁺細胞の発現を示した写真である。BALB/c 系、NOD 系、NZB 系、(NZB × NZW)F₁ 系、BXSB 系及び MRL/lpr 系の非免疫マウスの脾臓から切片を作製した。全てのマウスは生後 6~8 週間で使

用した。29-15 mAb で染色した GANP^{dense+}細胞は、NZB 系、(NZB x NZW)F₁ 系、MRL/lpr 系及び BXSB 系の赤脾臓に出現した。

図 5 は、自己免疫傾向マウスの赤脾臓領域における GANP^{dense+}細胞の発現を示した写真である。膝窩領域の LN 切片を 29-15 mAb で染色した。GANP^{dense+}細胞は、高齢の NZB 系マウス（10 月齢）及び MRL/lpr 系マウス（8 週齢）の末梢 LN に出現した。

図 6 は、自己免疫傾向マウスにおける GANP^{dense+}細胞の特徴づけを示した写真である。非免疫 NZB 系マウス（8 週齢）の脾臓切片を作製した。下記の試薬の一種と組み合わせて 29-15 mAb を用いて免疫組織化学的分析を実施した：抗 B220、PNA。

図 7 は、自己免疫傾向マウスにおける GANP^{dense+}細胞の特徴づけを示した写真である。非免疫 NZB 系マウス（8 週齢）の脾臓切片を作製した。下記の試薬の一種と組み合わせて 29-15 mAb を用いて免疫組織化学的分析を実施した：抗 IgM、抗 Syndecan-1、抗 BrdU mAb。

図 8 は、PAS 染色によって NZB 系マウスに現れるモット細胞を示した写真である。

図 9 は、マウス GANP 蛋白質の推定アミノ酸配列を 1 文字標記で示した図である。

図 10 は、GANP 蛋白質の構造を示した図である。図中、S/T rich region: セリン／トレオニンが豊富な領域、SAC3 homology region: SAC3 相同領域、nuclear localization signal: 核局在化シグナルを示す。4 つの LXXLL モチーフが存在する。

図 11 は、ganp 遺伝子のイン・サイチュ RNA ハイブリダイゼーションの結果を示した写真である。SRBC 免疫、非免疫 BALB/c 系、及び NZB 系マウスの脾臓切片を ganp アンチセンスプローブを用いてハイブリッド形成させた。図中、白脾臓領域 (WP)、赤脾臓領域 (RP) 及び GC 領域 (GC) を示す。NZB 系マウスの赤脾臓領域に GANP^{dense+}細胞が認められた。

図 12 は、GANP 蛋白質を免疫沈降後のウエスタンプロットで分析した結果を示した図である。GANP 蛋白質は、WEHI-231 系細胞の細胞質分画及び核分画で発現す

る 210kD の蛋白質として検出された。

図 1 3 は、正常 BALB/c 系マウスの脾臓 B 細胞を、ヤギ抗 IgM 抗体 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 及び抗 CD40mAb ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) の F(ab')₂ で 48 時間刺激し、抗 GANP mAb で染色した結果を示した図である。

図 1 4 は、抗 GANP 免疫沈降物を用いて [$\gamma - ^{32}\text{P}$] -ATP の存在下で 10 分間インピトロのキナーゼ反応を実施した結果を示した図である。蛋白質のリン酸化は、SDS-PAGE による分離の後、オートラジオグラフィーによって検出した。GANP のリン酸化を矢印で示し (図 A)、リン酸化 GANP 蛋白質のホスホアミノ酸分析も示した (図 B)。

図 1 5 は、マウス GANP 蛋白質の構造を示した図である。図中、SAC3 および Map80 と相同な領域、核局在化配列 (N L S s)、およびコイルドーコイル領域を示す。4 つの LXXLL モチーフを黒で示す。

図 1 6 は、R T - P C R 分析の結果を示す。インピトロでの抗- μ -及び抗-CD40-刺激 B 細胞における ganpm RNA の活性化が示されている。HPRT をコントロールとして使用し、各鑄型の量を確認した。

図 1 7 は、インピトロキナーゼ反応の結果を示す。細胞溶解物を未刺激 (左) または刺激 (右) した細胞から調製し、抗 GANP 免疫沈降に付した。インピトロキナーゼ反応は [$\gamma - ^{32}\text{P}$] ATP の存在下において 10 分間抗 GANP(42-23) 免疫沈降物を用いて行った。蛋白質のリン酸化は SDS-PAGE 分離後にオートラジオグラフィーによって検出した。矢印はリン酸化された GANP の位置を示す。

図 1 8 は、GANP と M C M 3 の物理的会合を示す図である。WEHI-231 からの細胞溶解物を抗-GST、抗-GANP(42-23)、または抗-MCM3 Ab で免疫沈降した。SDS-PAGE で分離後、蛋白質を電気泳動により膜に移し、抗 M C M 3 - A b をプローブとして検出した。

図 1 9 は、GANP と M C M 3 の物理的会合を示す図である。WEHI-231 細胞溶解物からの抗-GST、抗-GANP(42-23) および抗-MCM3 免疫沈降物をインピトロキナーゼアッセイに付した。正常ウサギ血清 (N R S) を抗-MCM3 Ab のた

めのコントロールとして用いた。試料を 7 % SDS-PAGE で分離した。GANP および M CM 3 に対応するバンドを左側のパネルにおいて矢印で示した。右側のパネルでは、210-kDa のバンドの V 8 切断マッピングが同一の切断パターンを示した。コントロールとして、無関係の V 8 消化蛋白質を平行して分離した。

図 20 は、抗-MCM3 Ab と抗-CR1mA b または PNA との二重染色を行った結果を示す図である。MCM3 の発現は GC 領域で活性化された。

図 21 は、ヒト GANP 蛋白質の推定アミノ酸配列を 1 文字標記で示した図である。

図 22 は、ヒト染色体を用いて FISH 法によってヒト gapn と Map80 をマッピングした結果を示す写真である。

発明を実施するための好ましい形態

本発明の GANP 蛋白質の代表例は、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列により特定される蛋白質であり、210kDa の分子量を有し、かつキナーゼ活性を有することにより特徴付けられる。本発明により提供される GANP 変異蛋白質は、配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、1 個ないし数個、好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 10 個、最も好ましくは 1 ~ 5 個程度のアミノ酸残基が、置換、挿入、及び／又は欠失したアミノ酸配列により特定され、かつ配列番号 1 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列により特定される GANP 蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。これらの GANP 変異蛋白質はいずれも本発明の範囲に包含される。配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列により特定される蛋白質及びそのホモログは、当該蛋白質が由来する哺乳類動物の胚中心のセントロサイトで選択的に発現が増強される蛋白質である。

通常、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質の活性ドメインは、全長のアミノ酸配列の N-末端及び／又は C-末端からアミノ酸残基を欠失させたポリペプチドを製造し、そのポリペプチドのキナーゼ活性を測定することにより容易に確認することができる。本発明により提供されるポリペプチドは、GANP 蛋白質及び GANP 変

異蛋白質の活性ドメインからなるポリペプチド、及び該活性ドメインからなるポリペプチドを部分配列として含むポリペプチドであり、GANP 蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。また、本発明により提供される別のポリペプチドは、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチドであり、GANP 蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。

本発明により提供されるポリヌクレオチドは、DNA 及び RNA のほか、DNA 又は RNA に化学修飾を施したポリヌクレオチドをすべて包含している。本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という語は、天然に存在しないものを含めて最も広義に解釈しなければならない。本発明により提供されるポリヌクレオチドの代表例は、上記の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードする DNA 又は RNA である。また、本発明のポリヌクレオチドの別の例は、アンチセンスポリヌクレオチドである。

遺伝暗号の縮重を利用して、ポリヌクレオチドから生産されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができることは当業者に周知である。したがって、本発明のポリヌクレオチドには、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードする全てのポリヌクレオチドが含まれる。本発明の好ましい遺伝子の例として、配列表の配列番号 2 にマウス由来の GANP 蛋白質をコードする遺伝子を示し、また配列番号 4 にヒト由来の GANP 蛋白質をコードする遺伝子を示した。なお、GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列は、該変異体をコードする遺伝子の塩基配列から決定することが可能である。例えば、市販のプログラム（例えば、MacVector（登録商標、イーストマンケミカル社製）やGenetix（ソフトウェア開発社製））を用いて行うことができる。

本発明の範囲には、GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体が含まれる。アンチセンスポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドの一態様として提供されるが、本明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌク

レオチドであることを明示する場合に「アンチセンスポリヌクレオチド」という場合がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、GAP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12 塩基以上からなることが好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるためにには、必要以上に長い配列は好ましくない。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、GAP 蛋白質の生合成を阻害する場合には、12 塩基以上 30 塩基以下、好ましくは 15 塩基以上 25 塩基以下、より好ましくは 18 塩基以上 22 塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体には、天然に存在するか否かにかかわらず、塩基、リン酸、及び糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが全て包含される。代表的なものは、天然型のアンチセンス DNA 及びアンチセンス RNA である。非天然型のポリヌクレオチドとしては、例えば、メチルフオスフォネート型やフオスフォロチオエート型などのポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、当業者に利用可能なアンチセンス技術を用いて、目的の DNA や mRNA との結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性などに優れた様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体が得られる。

一般的には、ハイブリダイズのし易さの点では、RNA のループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体を設計することが好ましい。従って、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体についても、RNA のループ領域にハイブリダイズするものは好ましい例である。また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、又はスプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアン

チセンスボリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがつて、本発明のアンチセンスボリヌクレオチド又はその誘導体であって、GANP 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、及び／又はスプライス部位の相補的な配列を含むものは、発現抑制効果の観点から好ましい態様である。

現在、一般的に知られているボリヌクレオチド誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一が高められた誘導体として、好ましくはフォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体を挙げることができる。本発明のボリヌクレオチド及びその誘導体には、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスボリヌクレオチドのうち、天然型のアンチセンスボリヌクレオチドについては、化学合成機を使用して合成するか、GANP 蛋白質をコードする DNA を鋳型とする PCR 法により製造することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのボリヌクレオチド誘導体は、通常、化学合成により製造することができる。この場合には、化学合成機に添付されている説明書に従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いた HPLC 法により精製することが可能である。

本発明の GANP 蛋白質をコードするボリヌクレオチド、そのアンチセンスボリヌクレオチド又はそれらの一部（例えば、連続する 12 以上の塩基からなるボリヌクレオチド）であるボリヌクレオチドは、哺乳類動物の cDNA ライブラリーから GANP 蛋白質をコードする DNA をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このような目的には、連続する 15 塩基以上の塩基配列からなるボリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ボリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、前記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。

配列表の配列番号 2 または配列番号 4 に記載の塩基配列のうちの連続する 12 以上の塩基からなる DNA 又は該 DNA にハイブリダイズするボリヌクレオチド（ア

ンチセンスポリヌクレオチド)は、GANP 蛋白質をコードする DNA を cDNA ライブライリー等からスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

また、本発明の GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくはそのアンチセンスポリヌクレオチド、又はそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来の mRNA についてノーザンプロットハイブリダイゼーションを行うことにより、GANP 遺伝子由来の mRNA が発現している組織を見出すことが可能である。さらに 12 以上の塩基からなるポリヌクレオチドはポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)のプライマーとして用いることができ、PCR により GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドが得られる。また、プライマーを適宜選択することで、GANP 蛋白質の任意の一部をクローニングすることができる。

該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用する cDNA ライブライリーとしては、mRNA から作製されたものが好ましく使用できる。これらの cDNA ライブライリーからランダムサンプリングにより選択された一群の cDNA を検索の試料とすることができる。また、cDNA ライブライリーとしては市販のものも使用可能である。

前記で得た GANP 遺伝子とハイブリダイズする cDNA を適当なベクター(例えば、pGEX-4T-1 ベクター)に挿入した後、宿主(例えば、大腸菌)に導入することで形質転換体を作製することができる。ベクターの種類及び宿主の種類は特に限定されないが、宿主の種類に応じて適宜の発現用ベクターを選択して用いることが可能である。宿主としては、大腸菌等の細菌類、酵母、又は動物細胞のいずれも使用可能である。組換えベクターを大腸菌等の適当な宿主に導入して形質転換体を得る方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。

本発明の GANP 遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子 DNA の増幅又は蛋白質の発現を行わせ、GANP 蛋白質を製造することが可能である。形質転換体の製造及び培養については各種の成書及び報告があり、種々の手段が開発され、当業界で汎用されている。従って、当業者は本明細書に記載された塩基配列に基づい

て GANP 蛋白質を容易に製造することが可能である。細胞に遺伝子を導入する手法として、塩化カルシウム法、リポフェクション法、プロトプラスト法、エレクトロポーレーション法などを用いることができる。

培養物から目的蛋白質の分離及び精製は当業者に利用可能な手段を適宜組み合わせて行うことができる。例えば、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明の GANP 蛋白質を効率よく回収及び精製することが可能である。より具体的には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティーコロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法、及び逆相クロマトグラフィー法などを適宜選択して行えばよい。GANP 変異蛋白質をコードする遺伝子を用いることによって、GANP 変異蛋白質を同様に製造することができる。

また、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質は、他のボリペプチドとの融合ペプチドとして製造することも可能である。このような融合ペプチドも本発明の範囲に包含される。融合すべきボリペプチドの種類は特に限定されないが、例えば、細胞外分泌を促進するシグナルペプチドなどを挙げることができる。このような融合蛋白質の製造も形質転換体を用いて行うことができる。融合蛋白質を用いて GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を製造する場合には、融合蛋白質をプロムシン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理し、切り出された目的物を分離及び精製すればよい。

本発明の GANP 蛋白質若しくは GANP 変異蛋白質、又はそれらの部分ボリペプチドを用いて、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識する抗体を製造することができる。本発明の抗体は、哺乳類動物を GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質で免疫感作することによって当業界で汎用の方法に従って製造できる。該抗体が本発明の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識することは、ウェスタンプロット法、ELISA 法、又は免疫染色法（例えば FACS での測定）等により確認することが可能

である。免疫原としては、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のほか、それらの一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いてもよい。GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質の一部は 8 アミノ酸残基以上であることが好ましく、このようなポリペプチドは、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。

また、免疫した動物のリンパ球を用いて製造したハイブリドーマから產生されるモノクローナル抗体を本発明の抗体として用いてもよい。モノクローナル抗体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されている(『Antibodies, A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) 第 6 章)。また、本発明の抗体として、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントやキメラ抗体を用いることも可能である。なお、本発明の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質は、抗体を用いる方法又は抗体と酵素を用いる方法などによって検出可能である。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

実施例

実施例 1：マウス GANP 遺伝子のクローニングと発現の解析

<材料及び方法>

(1) 動物及び免疫化

BALB/c 系マウス及び Lewis 系ラットは、セアク・吉富 (Seac Yoshitomi Ltd.) (福岡) より購入した。NZB 系、NZW 系、(NZB × NZW)F₁ 系マウス (7 週齢、メス)、MRL/lpr 系マウス (8 週齢、メス) 及び BXSB 系マウス (7 週齢、オス) は、日本 SLC (静岡) より入手した。高齢の NZB 系マウス (10 月齢、メス) は、広瀬幸子博士 (順天堂大学医学部、病理学教室) より寄贈頂いた。NOD 系マウス (7 週齢、オス) は、宮崎純一博士 (大阪大学医学部、栄養生理化学教室) より提供頂いた。動物は全て熊本大学の動物研究開発センターで飼育した。BALB/c 系マウスはヒツ

ジ赤血球（日本バイオテスト研究所、東京）で複数回免疫した。免疫は 5 日間隔で静注により実施し、免疫組織化学的分析を行うために胸腺、脾臓、リンパ節(LN)及びバイエル板(PP)の切片標本を作製した。

(2) 細胞及び細胞培養

BALB/c 系マウスの脾臓 B 細胞を既報の通り (Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995) 増殖させた。この細胞を二酸化炭素を 5% 含むインキュベーター中 37°C で、熱不活化 FCS (大日本製薬株式会社、大阪) 10%、L-グルタミン (Biowhitteker、アメリカ・メリーランド州 Walkersville) 5mM、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 μg/ml、及び 2-ME 50 μM を含む RPMI-1640 培地 (Gibco-BRL、ドイツ・Gaithersburg) で培養した。

(3) 29-15 モノクローナル抗体 (以下、「29-15mAb」と略す。) の確立

(BALB/c x NZB)F₁ 系マウスより鉛物油を用いて確立したマウスの B 細胞系統である WEHI-231 系に対する mAb を、既報 (Kuwahara et al., J. Immunol., 152:2742-2752, 1994) の方法によって作製した。簡潔に説明すると、阪口らの方法 (Sakaguchi et al., EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J., 5:2139-2147, 1986) により、表面表現型 slgM⁺slgD⁺B220⁺を有する WEHI-231 系の細胞溶解液を、界面活性剤の非存在下、低張緩衝液中で調製し、リン酸緩衝液 (PBS) に対して透析した。この細胞溶解液を完全フロイントアジュバント (CFA) (Difco Laboratories、アメリカ・ミシガン州デトロイト) に懸濁して Lewis 系ラットの足の肉趾中に投与してマウスを免疫にし、不完全フロイントアジュバント (IFA) (Difco Laboratories) に懸濁して 4 日目と 8 日目に追加免疫を 2 回行った。9 日後、膝窩及び鼠径領域のリンパ節を切除し、リンパ様細胞懸濁液を調製した。ハイブリドーマの確立、HAT 培地 (Gibco-BRL) の選択、及びハイブリドーマクローンのリクローンングは、既述の通り行った (Kuwahara et al., J. Immunol., 152:2742-2752, 1994)。免疫組織化学的分析においてリンパ様細胞を染色する 29-15 mAb を選択した。

(4) 抗体及び試薬

親和精製したヤギの抗マウス μ 抗体の F(ab')₂ 断片 (ICN Pharmaceutical, Inc.、アメリカ・カリフォルニア州コスタメーサ)、ビオチン結合ピーナツ凝集素 (PNA) (Vector Laboratories, Inc.、アメリカ・カリフォルニア州バーリングーム)、ビオチン結合抗 CD35mAb (PharMingen, San Diego, CA)、アルカリホスファターゼ (ALP) 結合ヤギ抗ラット IgAb (#59301, ICN)、HRP 結合ヤギ抗ラット IgAb (ICN)、HRP 結合ストレプトアビシン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)、ALP 結合ヤギ抗マウス IgAb (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MI)、FITC 結合マウス抗ラット κ mAb (ICN)、PE 結合抗-B220mAb (PhaMingen)、および ALP 結合ヤギ抗ウサギ IgAb (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA) は購入したものを用いた。抗 B220 (RA3-6B2)、抗 μ (AM/3) 及び抗 δ (CS/15) などのビオチン結合 mAb は、当研究室で作製した。抗 CD40 mAb (LB429) は当研究室で確立した (Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995)。AM/3 及び CS/15 のハイブリドーマは、三宅健介博士 (佐賀医科大学、免疫学教室) より提供頂いた。ビオチン結合抗 Syndecan-1 は、ファーミングン (PharMingen) (アメリカ・カリフォルニア州サンディエゴ) より購入した。抗 BrdU mAb は、ノボカストラ・ラボラトリーズ・リミテッド (Novocastra Laboratories, Ltd.) (イギリス・ニューカッスル) より入手した。ウサギ抗マウス MCM3/P1 Ab は文献に記載されている (Kimura, H 他, 1994, EMBO J. 13, 4311-4320)。

(5) 免疫組織化学

免疫組織化学的染色は、既報の通り実施した (Ezaki et al., Arch. Histol. Cytol., 58:104-115, 1995; Yamanouchi et al., Eur. J. Immunol., 28:696-707, 1998)。簡潔に説明すると、BALB/c 系、NZB 系、(NZB × NZW)F₁ 系、NOD 系、BXSB 系及び MRL/lpr 系マウスより切除した標的器官を、OCT 化合物 (マイルス・インコーポレーティッド (Miles Inc.)、アメリカ・インディアナ州エルクハート) 中に置いた。ゼラチンコートしたスライドグラス上に置いた 6 μ m の凍結切片を完全に空気乾燥した。次にスライドグラスをアセトンで 10 分間固定し、続いて PBS で 15 分間再水和した。スライドグラスを 29-15 mAb と共に 60 分間インキュベー-

トし、PBS で数回洗浄した。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラット Ig 抗体 (ALP-抗ラット Ig、カタログ番号 59301、ICN Pharmaceutical, Inc.) と共にインキュベートした後、スライドグラスを PBS で 4 回洗浄した。スライドグラスはベクター・ブルー (Vector Laboratories) を使用して現像した。

二次染色のため、スライドグラスをビオチン標識 mAb 及びホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビシン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.、アメリカ・メリーランド州、ガイサースバーグ) と共にインキュベートした。p-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB、同仁化学研究所、熊本) で現像した後、切片を 1% グルタルアルデヒド・PBS 溶液で軽く固定した。生体内 (in vivo) で活発な増殖をしている細胞を検出するために、器官を採取する 1 時間前に BrdU (Sigma Chemicals Co.、アメリカ・ミズーリ州、セントルイス) を静脈内注射した。DNA 合成を行っている細胞は、抗 BrdU mAb 及び ALP 結合ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Sigma Chemicals Co.) で染色することによって検出し、ベクター・レッドで現像した (Matsuno et al., Cell Tissue Res., 257:459-470, 1989)。過ヨウ素酸シップ (PAS) 染色を既報 (Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997) の通り実施した。切片は全てアクアテックス (Aquatex) (E. Merck、ドイツ・ダルムシュタット) でマウントした。

(6) λ gt11 ベクターを使用した cDNA の分子クローニング

20mM IPTG に予め浸したニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell、ドイツ・ダルムシュタット) 上に融合タンパクを移した後、29-15 mAb の上澄を使用して、マウス脾臓、マウス骨髄、WEHI-231 細胞及び A20 細胞からの mRNA で構築された cDNA ライブラリーをスクリーニングした (Inui et al., J. Immunol., 154:2714-2723, 1995)。ファージプレートを 42°C で 4 時間インキュベーションし、次にプレートをフィルターで覆い、さらに 37°C で 4 時間インキュベーションした。フィルターを洗浄緩衝液 (Tween 20 0.1% 含有 PBS) で 3 回洗浄し、ブロック緩衝液 (0.1% Tween 20 含有 PBS、5% 脱脂乾燥乳) 中で 1 時間ブロックし、次に 29-15 mAb と共にインキュベートした。 125 I で標識したヒツジ抗ラット Ig 抗体 (Amersham、

イギリス・バッキンガムシャー)を使用したオートラジオグラフィーによって陽性のシグナルを検出した。最初の cDNA クローンは、融合タンパクとしてポリペプチドをコードすることができる 280bp の断片を含有していた。この最初の 280bp の断片を使用して、より長い cDNA クローンを別の WEHI-231 cDNA ライブラリーから単離した。二次 cDNA クローンの 4.9kb の断片は、最長の 4.5kb のオープンリーディングフレームをコードした。さらに 5'配列を決定するために、5'-RACE 法を利用した Gibco-BRL 社の race キットを使用した。

(7) 組織切片上のイン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーション

イン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーションを既報 (Kondo et al., Blood, 80:2044-2051, 1992) の通り実施した。パラフィン包埋切片をシラン化したスライドグラス上にマウントした。スライドグラスを脱パラフィン処理した後、ジゴキシゲニンで標識した gnp 280bp リボプローブを使用してハイブリダイゼーションを 50°Cで 16 時間実施した。スライドグラスを TNE 緩衝液 (10mM トリス塩酸 [pH7.6]、500mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA) で数回、37°Cで洗浄した後、2×及び／又は 0.2×SSC 溶液で 50°Cで洗浄した。抗ジゴキシゲニン抗体を使用しつつ、ALP 基質の存在下で発色させた。

(8) GST-cDNA 融合タンパク及び別の抗 GANP mAb の作製

GANP の一部 (配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 679~1028 番のアミノ酸) をコードする gnp cDNA 断片を pGEX-4T-1 ベクター (Pharmacia Biotech、アメリカ・ニュージャージー州 Piscataway) に導入した。組換えプラスミドは全ての挿入及び結合についての DNA 塩基配列決定で確認した。GST-GANP 融合タンパクは、グルタチオン-セファロース (Pharmacia) カラムクロマトグラフィーによって、既報 (Inui et al., J. Immunol., 154:2714-2723, 1995) の通り作製した。42-43 と命名した抗 GANP mAb は、上述のようにラットにおける融合タンパクの免疫によって確立した。

(9) ウエスタンプロット分析

蛋白質ゲル電気泳動、ウェスタンプロット転移及び蛋白質の免疫検出を既報

(Kuwahara et al., Int. Immunol., 8:1273-1285, 1996) の通り実施した。5,000 万個の細胞を 1ml の TNE 溶解緩衝液 (10mM トリス塩酸[pH7.8]、150mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA、1%NP-40、0.02%NaN₃) で溶解し、免疫複合体を SDS-PAGE (7%) で分析した。蛋白質をニトロセルロースフィルター上に移した後、脱脂乾燥乳を 5% 含有する PBS-Tween 20 でフィルターをブロックし、抗 GANP mAb と共に 60 分間インキュベートした。PBS-Tween 20 で数回洗浄した後、フィルターを HRP 結合ヤギ抗ラット Ig (ICN Pharmaceutical, Inc.) と共に 30 分間インキュベートした。ECL 検出キット (Amersham) を使用して発色させた。

(10) 亜細胞分画化

完全な核を既報 (Schriber et al., Nucleic Acids Res., 17:6419, 1989) の通り分離した。WEHI-231 系細胞を TBS で洗浄し、ペレットを緩衝液 A (10mM HEPES[pH 7.9]、10mM 塩化カリウム、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA、1mM DTT、0.5mM PMSF) 中に再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートし、NP-40 を最終的に 1% になるように加えた。遠心分離の後、上澄を細胞質分画として回収した。ペレットを同一の緩衝液で再懸濁及び均質化し、染色によって完全な核を得た。試料を遠心分離し、ペレットを冷緩衝液 C (20mM HEPES[pH 7.9]、0.4M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM DTT、1mM PMSF) に再懸濁し、遠心分離した。上澄を核分画として -80°C で凍結した。

(11) イン・ビトロのキナーゼ反応及びホスホアミノ酸分析

イン・ビトロでのキナーゼ反応を免疫沈降物を用いて既報 (Kuwahara et al., J. Immunol., 152:2742-2752, 1994) の通り実施した。脾臓 B 細胞を既報 (Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995) の方法によって精製した。B 細胞は既報 (Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995) の通り、イン・ビトロでヤギ抗 IgM 抗体及び抗 CD40mAb (LB429) の F(ab')₂ 分画で 48 時間刺激した。細胞を集めて洗浄した後、TNE 溶解緩衝液で溶解し、抗 GANP mAb (42-23) で免疫沈降させた。免疫沈降物は [γ-³²P]-ATP (Amersham) と共にインキュベートし、放射性標識した蛋白質を SDS-PAGE (7%) を用いてオートラジオグラフィーで分析

した。GANP に対応するバンドを乾燥ゲルより除いた。SDS をゲルから除去した後、均質化したゲルを TPCK-トリプシン (Sigma Chemicals Co.) によって 37°Cで一晩消化した。試料は 6N 塩酸で加水分解し、TLC (E. Merck) 上で電気泳動した。

示された蛋白質の V 8 切断マッピングは既報の通りに行つた (Kuwahara, K., 他、1994, J. Immunol. 152:2742-2752)。

(12) 細胞質染色

細胞を 2.5% パラホルムアルデヒド・PBS 溶液で固定し、氷上 70% エタノールに 1 時間浸透化した。細胞を 29-15 mAb 及び FITC 結合マウス抗ラット κmAb と共にインキュベートした。抗体結合は、FACScan フローサイトメトリー (Becton-Dickinson、アメリカ・カリフォルニア州マウンテンビュー) で分析した。

(13) 免疫沈降-ウエスタンプロット分析

上記 (10) 亜細胞分画化で得た蛋白質を、プロテイン G-セファロースと組み合わせて抗 GANP mAb と一緒に免疫沈降し、SDS-PAGE で分析した。ウエスタンプロットフィルターを抗 GANP mAb とインキュベートし、次いで HRP-抗ラット Ig とインキュベートした。現像は ECL 検出キット (Amersham) を用いて行つた。

(14) 逆転写酵素PCR (RT-PCR)

TRISOL (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いて培養 B 細胞から精製した全 RNA (各々 1 μg) を Superscript (Gibco BRL) を用いる cDNA 合成 (100 μl 容量) のための錆型として用いた。PCR 増幅は、Taq-Gold (Perkin-Elmer, Foster, CA) および gnp または HPRT (対照) のためのプライマー (Han, S., 他、1996. Science. 274:2094-2097) と用いて、各 cDNA 溶液 2 μl を用いて行った。gnp 転写物は 5'-CCGTGGGATGACATCATCAC-3' (フォワードプライマー) (配列表の配列番号 5) および 5'-CATGTCCACCATCTCCAGCA-3' (リバースプライマー) (配列表の配列番号 6) により増幅された。

<結果>

(1) リンパ様器官における GANP 抗原の発現

WEHI-231 系細胞の溶解液でラットを免疫することによって末梢 B 細胞中に発現する分化抗原を認識する mAb を作製した。BALB/c 系マウスの正常リンパ様器官について、29-15 mAb を使用した免疫組織化学的分析では、骨髓中の発現は検出されなかつたが、胸腺、脾臓及びリンパ節などのリンパ様器官ではわずかな発現が認められた。脾臓の赤脾髄及びリンパ節の副皮質では少数の細胞が 29-15 抗原を強く発現していた。発現が PP の滤胞の中心領域において非常に強かつたことは興味深い（図 1）。細胞は抗 B220 mAb で陽性であり、一方、抗 IgD mAb では陽性ではない。正常マウスは、小腸管腔を通じて導入された種々の抗原物質の継続的刺激のために、PP 中の明瞭な GC と共に二次リンパ様滤胞を与えた。

ヒツジ赤血球 (SRBC) による免疫を繰り返すことで、12 日以内に脾臓中にリンパ様滤胞が形成された。抗原免疫化によって、PP の GC に加えて、脾臓及びリンパ節の GC 領域においても 29-15⁺細胞が出現した（図 2）。29-15 抗原は GC の細胞中で増強していた。二次リンパ様滤胞の構造において 29-15⁺細胞の表現型をさらに分析したところ、ほぼ半数の PNA⁺ GC-B 細胞が 29-15 mAb に陽性であり、一方、抗 BrdU mAb には陰性であった（図 3）。興味深いことに、29-15 抗原の発現は、中心溝動脈からの入口の遠位領域でセントロサイトにおいて増強されていた。この表現型は GC-B 細胞の判定基準と一致しており、すでに述べたように 29-15 抗原の「GANP」という名の裏付けとなっている。

(2) 自己免疫傾向 NZB 系マウスの赤脾髄領域における GANP^{dense+}B 細胞の出現

イン・ビボの刺激がない場合、正常マウスは脾臓の滤胞領域でほとんど GANP⁺B 細胞を発現しないが、BALB/c 系（図 2）及び C57BL/6 系の赤脾髄領域では GANP 蛋白質が著しく発現している GANP^{dense+}細胞が少々認められた。この細胞は大型であり、普通の B 細胞とは明らかに異なる。しかし、若齢の NZB 系マウス（8 週齢）では、この GANP^{dense+}細胞は、免疫のない脾臓の赤脾髄領域で自然に増加した（図 4）。別の自己免疫傾向マウスである NZW 系では、5~12 週齢において赤脾髄では

GANP^{dense+}細胞を発現していなかったが、重篤な疾患の組合せである(NZB x NZW)F₁系では、赤脾髄において GANP^{dense+}細胞が中程度発現していた。

他の自己免疫傾向マウスの脾臓において GANP^{dense+}細胞も自然に現れるか否かを検討した。GANP^{dense+}細胞は、BXSB 系及び MRL/lpr 系の脾臓に出現するが、特定の病原がない状態 (SPF) の同様の週齢の NZW 系及び NOD 系マウスでは顕著な出現は認められなかった。GANP^{dense+}細胞は加齢の間に識別できるようになり、発病した老齢の NZB 系マウス (10 月齢) の末梢リンパ節に出現した。GANP^{dense+}細胞はリンパ節では大部分が後期の段階に出現するようであり、MRL/lpr 系では若齢の段階 (8 週齢) でリンパ節に GANP^{dense+}細胞が出現することは特に興味深い (図 5)。これらの結果から、自己免疫傾向の NZB 系、BXSB 系及び MRL/lpr 系マウスの遺伝的因子は、赤脾髄領域における GANP^{dense+}細胞の出現及びリンパ節内への漸増を制御する可能性があることが示唆される。

二色分析によって、赤脾髄における GANP^{dense+}細胞の表現型が PNA⁻B220⁻細胞 (図 6) 及び IgD⁻CD38⁻細胞として示された。これらの細胞は、形質細胞を選択的に染色する抗 Syndecan-1 mAb で染色した場合に陽性となる。GANP^{dense+}細胞は細胞質で IgM を発現するが (図 7)、この細胞がモット細胞である可能性があることから (Jiang, Y., S. Hirose, Y. Hamano, S. Kodera, H. Tsurui, M. Abe, K. Terashima, S. Ishikawa 及び T. Shirai. 1997. J. Immunol. 158:992-997)、PAS 染色で切片を染色したところ、GANP^{dense+}細胞は、B220⁻Syndecan-1⁺PNA⁻BrdU⁻ GANP^{dense+} (図 8) 及び CD40⁻CD38⁻とともに PAS⁻であった。この形質様細胞は NZB 系マウスの脾臓において優先的に現れるが、現在報告されているモット細胞とは異なる。

(3) GANP 抗原をコードする cDNA クローンの同定

我々は、29-15 mAb を使用して、WEHI-231 系 cDNA ライブラリーより候補の cDNA クローン (280bp の挿入 DNA を有する) を単離し、さらに *ganp* と命名したより長い cDNA を単離した。スクレオチド配列の全長 (6429bp) をオーバーラップクローンで決定することによって、分子の大きさが 210kD と予測される 1971 個のアミノ酸からなるポリペプチドが推定された (図 9)。GANP 蛋白質のアミノ酸配列を配

列表の配列番号 1 に、ganp cDNA の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示す。

GANP アミノ酸配列は、温度突然変異体であるサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に特徴的な核転写調節因子であると考えられる SAC3 およびヒト Map 80 蛋白質 (Takei, Y 他, 1998, *J. Biol. Chem.* 273:22177-22180) と部分的に相同意を示す (図 10 および図 15; Bauer, A. 及び R. Koelling, 1996, *Yeast* 12:965-975)。また、GANP 蛋白質は、インスリン促進因子 (アミノ酸 996 ~1063)、及び NF-IL-6 (アミノ酸 388~450) を含む種々の転写因子の短い領域内に低い相同意を示す。

GANP 遺伝子は超らせんモチーフのコンセンサス塩基配列を有するが、シンクフィンガー、ロイシンジッパー及びホメオドメインのモチーフは認められない。セリン／トレオニンの豊富な領域が N-末端の 100 個のアミノ酸中に認められたが、この領域は核膜孔複合体として知られるヌクレオボリンとわずかに相同意を有していた。GANP は二つの核局在配列 (⁴⁹⁷HKKK 及び ¹³⁴⁴PMKQKRR) を有するが、これらは PSORT プログラムで示唆されるように、核における GANP の発現に関与している可能性がある。GANP はまた 2 つのコイルドーコイルモチーフを有するが、シンクフィンガー、ロイシンジッパーあるいはホメオドメインモチーフは有していない。さらには、CBP/p300 および p/CIP を含む核転写コ・アクティベータ分子中に認められる 4 つの LXXLL モチーフが存在していたが (Torchia J. et al., 1997, *Nature (Lond.)*, 387:677-684; Heery et al., 1997, *Nature (Lond.)*, 387:733-736)、これらのモチーフを通じた会合分子は同定されていない。

(5) ganp 転写の発現

ノーザンプロット分析によって 7kb の mRNA が検出されたが、対照の β -アクチンのシグナルに比較して非常に弱いシグナルであり、その発現は試験を行った全ての細胞系、器官及び組織においてかなり偏在していた。29-15 mAb により切片上に検出された領域と同一の領域で ganp mRNA が増強されるか否かを検討するために、イン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーション分析を行なったところ、ganp mRNA が SRBC で免疫した脾臓の GC の中央領域において大量に発現されおり、一方、

免疫されていない脾臓(図11)、胸腺、及びリンパ節では発現されていなかった。ganp mRNAは免疫したマウスのGC-B細胞において増強されたが、この発現パターンは、同一の切片上のヘマトキシリン染色に基づく29-15 mAbによる結果と非常に類似していた。非免疫BALB/c系マウスにおいては、PPのGC領域でもganp mRNAが増強されており、ganp mRNAの発現は、非免疫NZB系マウスの脾臓の赤脾髄領域の形質様細胞で盛んであった(図11)。これらの結果から、ganp遺伝子が29-15 mAbによって認識される分子をコードすることが示唆される。

(6) B細胞におけるGANPの発現

抗GANP mAb(42-23)によって、WEHI-231系細胞の核及び細胞質の両区画から、210kDの一本の蛋白質バンドが検出された(図12)。つぎに、B系列細胞の活性化及び分化にGANPが機能的に関係する証拠を見出す目的で、非免疫BALB/c系マウスのB細胞を抗IgM及び抗CD40を併用してイン・ビトロで刺激したところ、抗GANP mAbで検出されるGANP蛋白質の発現が増加した(図13)。イン・ビトロのGANP免疫沈降物とのキナーゼ反応では、イン・ビトロで刺激された脾臓B細胞においてGANP蛋白質に結合しているキナーゼ活性が上昇した。従って、GANP蛋白質では、セリン／トレオニン残基にリン酸化が誘発される(図14)。これらの結果から、末梢免疫応答において、GANPがB細胞を活性化している可能性が示唆された。

また、抗 μ A bおよび抗CD40 mAbによる刺激は最大応答を示したが、これらの何れか片方では、僅かの応答のみを示した(データは示さず)。この活性化はまた、インビトロでの抗- μ および抗-CD40コ・ライゲーションによって刺激されたB細胞におけるganpmRNAの増加によっても検出された(図16)。コントロールHPRTmRNAと比較して刺激後24時間および48時間においてganpmRNAの量が増大することがRT-PCRにより明確に実証された。

210kDaのGANP蛋白質は多数の潜在的リン酸化部位を有しているので、我々は抗GANP免疫沈降物とのインビトロキナーゼ反応によるリン酸化の誘導を試験した。図17に示される通り、210kDaの蛋白質のリン酸化が、抗- μ および抗-C

D 4 0 コ・ライゲーションによって刺激された脾臓B細胞からの抗-GANP 免疫沈降物中に見られた。この結果は、GANP が沈降してもキナーゼ活性が維持されることを示している。

(7) GANP とMCM3蛋白質との会合

我々は、GANP のカルボキシル末端にMap80 相同領域（アミノ酸レベルで 76.3 %の同一性）を見つけた。Map80 は、MCM3 (DNA複製に必須の蛋白質) の細胞質と核の間の転移に関与する 80 kDa の核蛋白質である (Takei, Y. 他, 1998, J.Biol.Chem. 273:22177-22180; Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320; Chong, J.P. 他, 1996, Trends Biochem.Sci. 21:102-106; 及び Romanowski, P. 他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425)。そこで、我々は WEHI-231 における GANP と MCM3 との相互作用について試験した。我々は、抗 GANP 免疫沈降物に MCM3 が含まれていることを検出した。MCM 蛋白質のリン酸化状態は細胞周期の進行の調節において決定的であるようなので (Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320; Chong, J.P. 他, 1996, Trends Biochem.Sci. 21: 102-106; 及び Romanowski, P. 他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425)、抗 MCM3 免疫沈降物を用いてインビトロキナーゼアッセイを行った。MCM3 の免疫沈降により 210 kDa の位置にリン酸化蛋白質が同時に沈降し、これは GANP と同じサイズである (図 19 の左のパネル)。抗 GANP と抗 MCM3 免疫沈降物由来のこれらの 210 kDa のバンドは V8 切断マッピングにおいて同一のパターンを示し (図 19 の右のパネル)、GANP と MCM3 とが B 細胞株中で会合していることが示唆される。

次に、我々は、MCM3 がインビオでマウスの抗原免疫化によって GC-B 細胞において活性化されるかどうかを試験した。上記で使用したものに隣接する切片を抗 MCM3 Ab で染色した (図 20)。MCM3 は GCs においても活性化されている。二重染色により MCM3 と PNA の両方の同時局在が明白に実証された。GC 領域の一部は FDCs (リンパ濾胞細胞) によって強く囲まれている。これらの結果により、MCM3 は、FDCs によって大部分が囲まれているセン

トロblast および GANP⁺セントロサイトを含む GC-B 細胞で活性化されていることが実証された(図 20)。

(8) 考察

以上のように、本発明者らは、脾臓の二次濾胞の明領域に局在する GC-B 細胞で発現される新規な蛋白質である GANP を見出した。正常の条件下では多種類の細胞で痕跡量の *ganp* mRNA が検出可能であるが、GANP 蛋白質は免疫されたマウスの特定の GC 領域で増強される。多数の研究によって、mAb を用いて又は特異的な cDNA クローニングによって認識される分子として、GC 中の種々の分化抗原が示されている(Christoph et al., Int. Immunol., 6:1203-1211, 1994; Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:10222-10227, 1996; Kuo et al., J. Exp. Med., 186:1547-1556, 1997)。ほとんどの分子は GC-B 細胞の全領域に出現するが、8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼは暗領域において発現する(Kuo et al., J. Exp. Med., 186:1547-1556, 1997)。

GANP 抗原が明領域であるセントロサイトにおいて選択的であることは興味深い。最近の研究では、免疫グロブリン遺伝子の再構成に必要な RAG 蛋白質は明領域のセントロサイトにおいて選択的に発現していることが示されている(Hikida et al., Science (Wash. DC), 274:2092-2094, 1996; Han et al., Science (Wash. DC), 274:2094-2097, 1996)。パパバシリオウラ及びハンラによって示されているように(Papavasiliou et al., Science (Wash. DC), 278:298-301, 1997; Han et al., Science (Wash. DC), 278:301-305, 1997)、GC 領域は T 細胞依存性の抗体応答の間に起こる二次 Ig 遺伝子再構成の部位を提供しているので、GANP 蛋白質は、セントロサイト段階での抗原特異的 B 細胞の成熟に関係する成分であるかも知れない。

我々は、GANP のカルボキシル末端部分が MCM3 の核転移を容易にするヒト Map80 (Takei, Y 他, 1998, J. Biol. Chem. 273:22177-22180) と有意な類似性を有することを見出した。免疫沈降実験により GANP が WEHI-231 における MCM3 にも結合することが実証された。MCM3 は、DNA 複製の開始に必須である M

CM蛋白質ファミリー(Kimura,H.他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320; Blow,J.J. 1993. J.Cell Biol.122.993-1002; Tye,B.K. 1994. Trends Cell Biol.4:160-166; Chong, J.P.他, 1996, Trends Biochem.Sci.21:102-106; Romanowski,P.他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425 及び Thommes,P. 他 , 1992, Nucl.Acids Res. 20:1069-1074)の一員である。核MCM蛋白質の主要画分はS期の開始時にクロマチンに結合するが、複製中に解離し、核質に遊離蛋白質として蓄積する。クロマチンからのMCMsの放出は複数のMCM蛋白質のリン酸化によって達成され、有糸分裂後のそれらの再会合はそれらの脱リン酸化を付随する。MCM蛋白質は、増殖が抑制された分化中の細胞では合成されず、半減期に関連した速度で消滅するようである (Musahl,C.,他, 1998, Exp.Cell.Res.241, 260-264)。MCM3蛋白質は最近、アポトーシス性蛋白質分解の初期の標的であることが示された (Schwab,B.L.他, 1998, Exp.Cell Res. 238:415-421)。Schwab,B.L.他は、MCM3の活発な破壊がMCM複合体を不活性化し、細胞死プログラムの実行中の時期外れのDNA複製現象を防止する役割を担っていることを提唱している。我々の結果は、GC-B細胞が高レベルのMCM3を発現し、そのうちのあるものはGANPと会合することを示している。しかし、細胞周期を停止した分化した細胞で活性化された蛋白質が、S期の進行に必須な別の蛋白質に結合することは奇妙である。GANPの機能は、結合を通じてのMCM3蛋白質の不活性化であることが推測される。免疫組織化学データは次の考えと一致する。GANPは、増殖を停止したセントロサイトで活性化される一方、MCM3は急速に周期しているセントロプラストそしてG Csのセントロサイトでも発現している。MCM3の量は遺伝子発現と活発な破壊を停止することによって減少するであろうが (Musahl,C.,他, 1998, Exp.Cell.Res.241, 260-264 ; 及び Schwab, B.L.他, 1998, Exp.Cell Res. 238:415-421)、GANPとの相互作用を通じてのセントロサイトで依然発現するMCM3の不活性化は、DNA複製を防止する別の機構であるかもしれない。さらに、GANP およびMCM3は共に同時沈降するキナーゼによってリン酸化されるようになる(図19)。高度にリン酸化されたMCM3は不活性化形態であると考えら

れるため (Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320)、GANP との会合は MCM 3 のリン酸化を刺激するかもしれない。

さらに、GANP 蛋白質は酵母のサッカロミセス・セレビシエの SAC3 分子 (SAC、アクチンのサプレッサー) と密接な相同性を有しているが、この菌はアクチン遺伝子において温度感受性突然変異 (*act1-1*) のサプレッサーの遺伝的スクリーニングで単離されたものである (図 10 ; Novick et al., Genetics, 121:659-674, 1989)。SAC3 蛋白質は核で発現しており、有糸分裂の正常な進行及び染色体の損失に対する保護のために必要である (Bauer et al., J. Cell Sci., 109:1575-1583, 1996)。また、SAC3 の欠失(null)変異体は非常にゆっくりと成長し、野生型の細胞よりも大型である。SAC3 はアクチン細胞骨格及び有糸分裂の両方に影響する過程に関与しているが、これは SAC3 がアクチン又はアクチン結合蛋白質の遺伝子発現を調節することを示している。

サッカロミセスにおいてロイシン透過酵素活性の転写を増加させる遺伝子 (LEP-1 と呼ばれる) は、SAC3 と同一である (Stella et al., Yeast, 11:460-460, 1995)。LEP-1 遺伝子は、選択的アミノ酸輸送に関する酵母菌ロイシン透過酵素の増強を引き起こすが、真核細胞におけるアミノ酸輸送、特にアミノ酸透過に関する分子に関してはよく判っていない (Mastroberardino et al., Nature (Lond.), 395:288-291, 1998)。SAC3/LEP-1 配列は多数の転写因子と相同的モチーフを示さないが、すでに決定された生物学的機能 (Bauer et al., J. Cell Sci., 109:1575-1583, 1996) からは、この配列が核において種々の標的遺伝子の調節活性を有することが示唆されている。マウスの GANP は、核転写因子に対する典型的なコンセンサスモチーフを示さないものの、酵母の SAC3 遺伝子と共に先祖をもち、可能なリン酸化部位、2 つの核の局在化配列、及び他の転写分子と相互作用する可能性がある 2 つの超らせん構造と構造的に類似している。

GANP は、A g 免疫化した脾臓のセントロサイトにおいて選択的に活性化されている。それは、G C 領域中の F D C s と密接に相互作用するセントロサイトサブセットを特定するための分化マーカーとしても有用である。我々の研究は、B C

R シグナルと CD 40 同時刺激が一緒になって GANP の活性化を引き起こし、GANP / MCM3 複合体を介したシグナル伝達を誘導することを示した。

常染色体の劣性遺伝子疾患の自己免疫多腺性内分泌障害 (APECED) における欠損遺伝子は、ヒト第 21 染色体 (21q22.3) の連鎖分析によって場所が特定されるが、この遺伝子は可能な転写レギュレーターで AIRE 遺伝子産物をコードしており (Nagamine et al., *Nature Genet.*, 17:393-398, 1997)、この自己抗体は副腎及び他の生殖腺産生組織で発現される AIRE 蛋白質を認識している。APECED の研究から、核コ・アクティベータ活性を有する分子の関与が自己免疫と関係する可能性が考えられる。AIRE 及び GANP の両蛋白質は、転写レギュレーターの典型的なドメインを有していないが、核転写コ・アクティベータにおいて同様に観察されるような LXXLL モチーフを有している。

B 細胞特異性核コ・アクティベータ (Bob1/OCA-B/OBF1) は、最近、細胞型特異性レギュレーターである Oct1 及び Oct2 として特徴付けられた (Luo et al., *Mol. Cell. Biol.*, 15:4115-4124, 1995)。OCA-B 標的マウスでは、T-依存性抗原を用いた免疫の後、脾臓において GC 形成の障害が認められるが、これは GC 領域において B 細胞成熟が機能的に関与することを示唆している (Kim et al., *Nature (Lond.)*, 383:542-547, 1996; Qin et al., *EMBO J.*, 17:5066-5075, 1998)。GANP 蛋白質はセントロサイトにおける OCA-B 細胞の制御下に発現される可能性があり、核コ・アクティベータ分子の分子的相互作用の問題は、GC における B 細胞成熟を理解するために重要であると思われる。

SLE のニュージーランドモデルは、疾病感受性遺伝子の染色体位置をマッピングするためのゲノム連鎖研究の実験材料である。腎炎、及び第 4 染色体上 (Nba1 と称する)、第 7 染色体上及び第 1 染色体上 (Nba2 と称する; Vyse et al., *J. Immunol.*, 158:5566-5574, 1997) などの自己抗体産生に連鎖する少なくとも 12 の非MHC 遺伝子座がそれぞれ独立にマッピングされた。大型細胞上の GANP 抗原は、非免疫 NZB 系マウスの赤脾臓領域で高度に増強されるが (図 4 ~ 8)、NZB 系マウスは、赤脾臓領域にモット細胞と呼ばれる類似の大型 IgM 産生細胞を有していた。

モット細胞は、NZB 系及び(NZB × NZW)F1 系マウスにおいて選択的に現れるが、正常 BALB/c 系又は C57BL/6 系マウスには出現しない。

モット細胞の前駆細胞はおそらく B-1 B 細胞であり (Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)、このことは B 細胞が自己免疫と密接に関係することを示唆している。モット細胞は、細胞質において IgM の封入体によって識別され、PAS で陽性に染色される (Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)。GANP^{dense+}細胞はモット細胞であると思われる所以 PAS 染色を行ったところ、NZB 系マウスの赤脾髄領域の GANP^{dense+}細胞は PAS⁻であった。GANP^{dense+}IgM 産生細胞はモット細胞と同様に NZB 系マウスの脾臓中に現れるが、これらの細胞は異なるものであった。疾患感受性にリンクする染色体の遺伝子座の一つに関係する異常 B 細胞集団の活性化が起こり得るが、この活性化によって IgM 産生細胞の新しい型が生じるのかもしれない。

いくつかの研究グループから報告された Lyn^{-/-}マウス及び CD40L^{-/-}マウスは、類似した自己免疫及び高 IgM 症候群を示すが、これらの状態では封入体を有する免疫芽細胞が脾臓において多く認められる (Hibbs et al., Cell, 83:301-311, 1995; Nishizumi et al., Immunity, 3:549-560, 1995; Xu et al., Immunity, 1:423-431, 1994)。これらの観察から、BCR 及び CD40 によるシグナルの形質導入によって、異常抗体産生形質細胞の産生が調節されていることが示唆される。また、抗 IgM 及び抗 CD40 抗体で脾臓 B 細胞を刺激することによって GANP 蛋白質のリン酸化活性が誘発されるが、この観察から、GANP 蛋白質が GC 領域における B 細胞活性化部位の下流と関係し得ること、及び NZB 系マウスにおける異常 B 細胞活性化が、GANP 蛋白質の発現の増加に関係し得ることが示唆された。

実施例 2：ヒト GANP 遺伝子のクローニング

ラットの GANP 遺伝子の配列の情報に基づいてヒトの GANP 遺伝子のクローニングおよび配列決定を行った。具体的には、λgt11-ヒト heart cDNA ライブラリー

(Clontech) を使用し、プライマーとして gsp1-1 : TTTGTCTGGAGGATGATCGC (配列表の配列番号 7)、gsp1-2 : AAAGAGAAAGGGGCCAGGCC (配列表の配列番号 8)、および gsp1-3 : CCAGCTTCTTGTCCAAAAGC (配列表の配列番号 9) を使用し、さらに 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Gibco BRL)を用い、常法によりクローニングと塩基配列の決定を行った。

得られたクローンの塩基配列を決定した。得られたヒト GANP 遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 4 に示す。また、この塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号 3 および図 2 1 に示す。ヒト GANP 遺伝子はマウス GANP 遺伝子と高い相同性を示し、またヒト GANP はカルボキシル末端側に 80-kDa の Map80 ドメインを含んでいた。

In situ RNAハイブリダイゼーションにより、ganp 転写物は、扁桃腺の G C 領域で活性化されているようであった。GANP⁺細胞は、メモリーB細胞の CD 3⁺ Ig D⁻表現型を発現している。これらの結果は、ヒト GANP が二次リンパ性組織における G C-B 細胞でも発現していることを示した。また、1980 アミノ酸から成るヒト GANP は、B細胞中の MCM3 蛋白質に結合する Map80 相同領域のストレッチを有することから、G C-B 細胞における細胞周期調節に GANP が関与していることが示唆される。

さらに、得られたヒト GANP 遺伝子とヒト染色体標本を用いて FISH 法により In situ ハイブリダイゼーションを行った。結果を図 2 2 に示す。図 2 2 から分かるように、ヒト GANP 遺伝子と Map80 を有するゲノム断片は染色体 21 番長腕 22, 3 にマッピングされた。

産業上の利用可能性

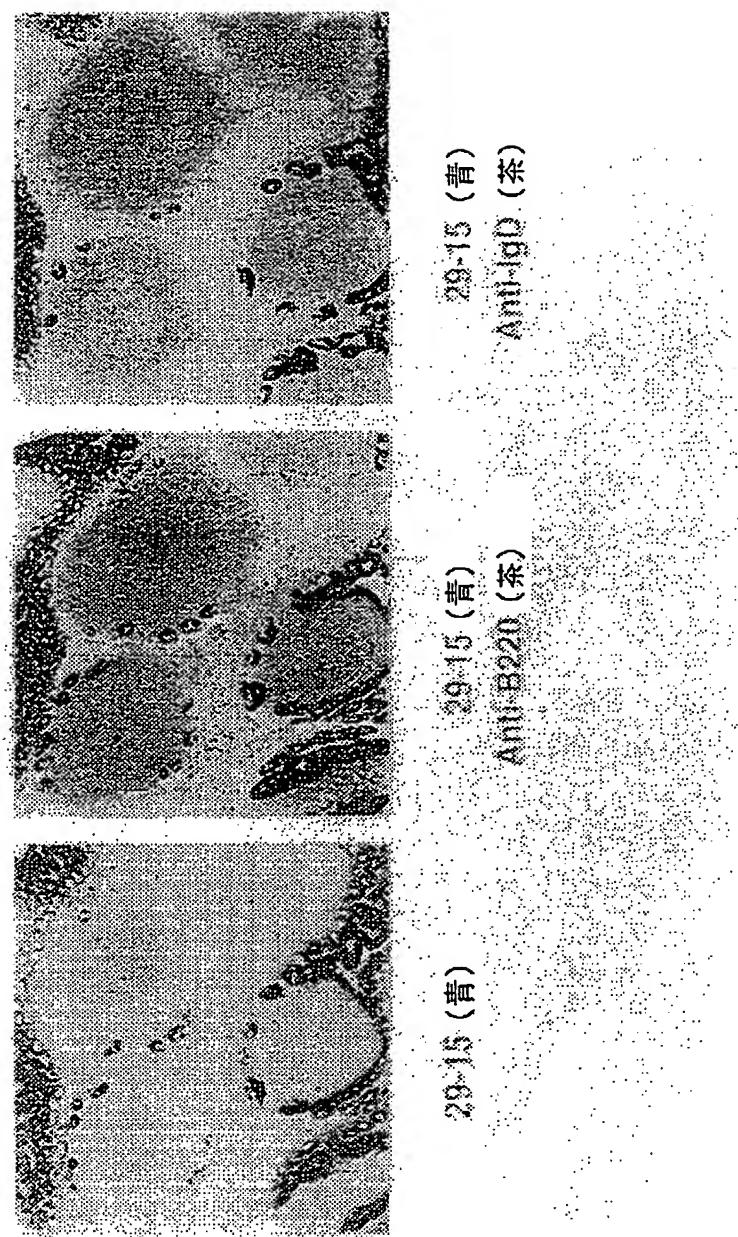
本発明の蛋白質はキナーゼ活性を有する新規な蛋白質であり、自己免疫状態において異常 B 細胞分化のシグナル変換に関する可能性がある。従って、本発明の蛋白質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド及び抗体は、自己免疫の機構を解明するのに有用である。

請求の範囲

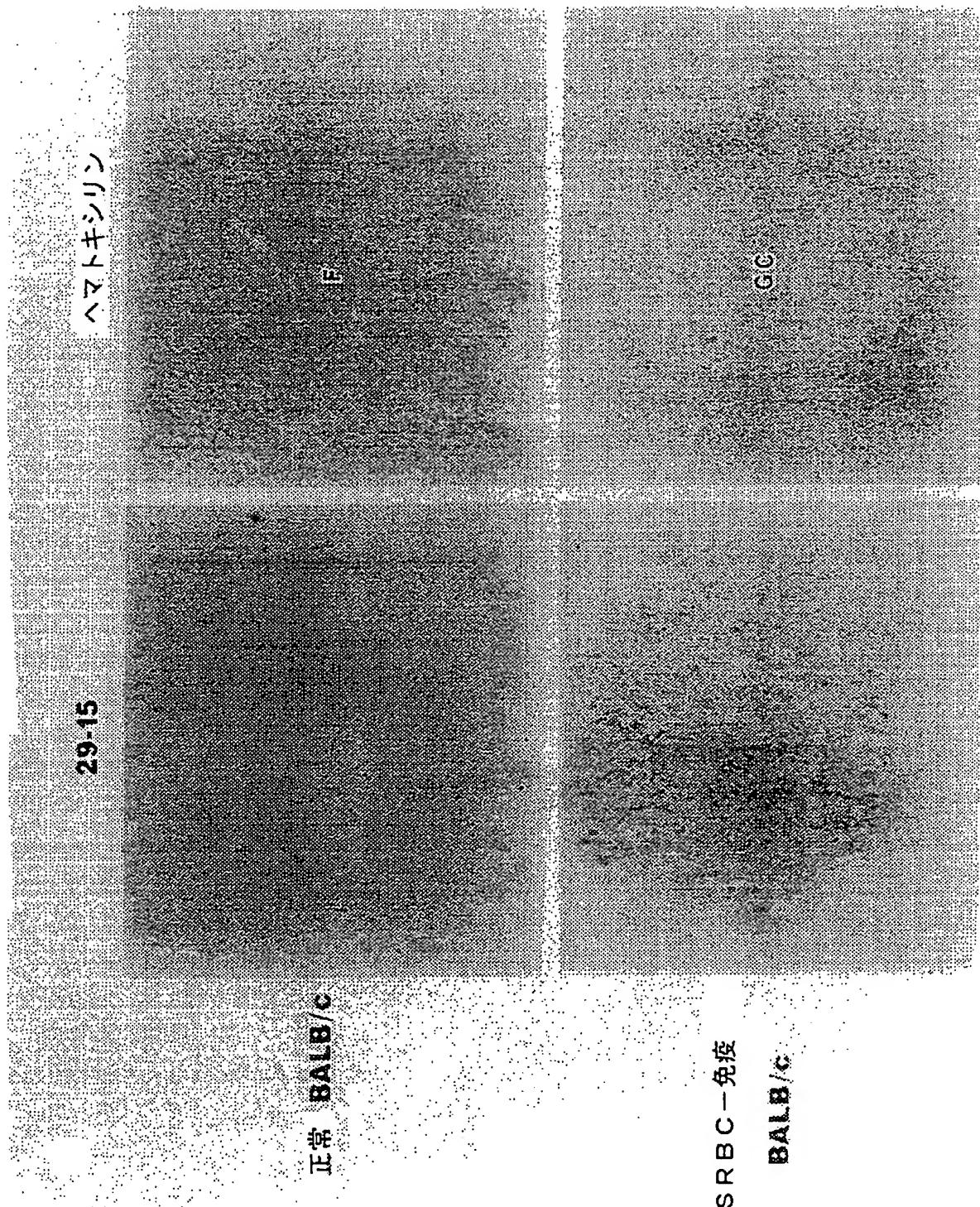
1. 配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列により特定される GANP 蛋白質。
2. 配列表の配列番号 1 または 3 に記載のアミノ酸配列において、一若しくは複数のアミノ酸が欠失しており、一若しくは複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び／又は一若しくは複数の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求の範囲第 1 項に記載の GANP 蛋白質と同様のキナーゼ活性を有する GANP 変異蛋白質。
3. 請求の範囲第 1 項に記載の GANP 蛋白質又は請求の範囲第 2 項に記載の GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチド。
4. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
5. 請求の範囲第 3 項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
6. 請求の範囲第 4 項又は第 5 項に記載のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド。
7. 請求の範囲第 4 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの部分配列であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチド。
8. 化学修飾された請求の範囲第 4 項ないし第 7 項に記載のポリヌクレオチド。
9. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質を認識する抗体。

第1図

Expression of GANP antigen in B cells of Peyer's patches



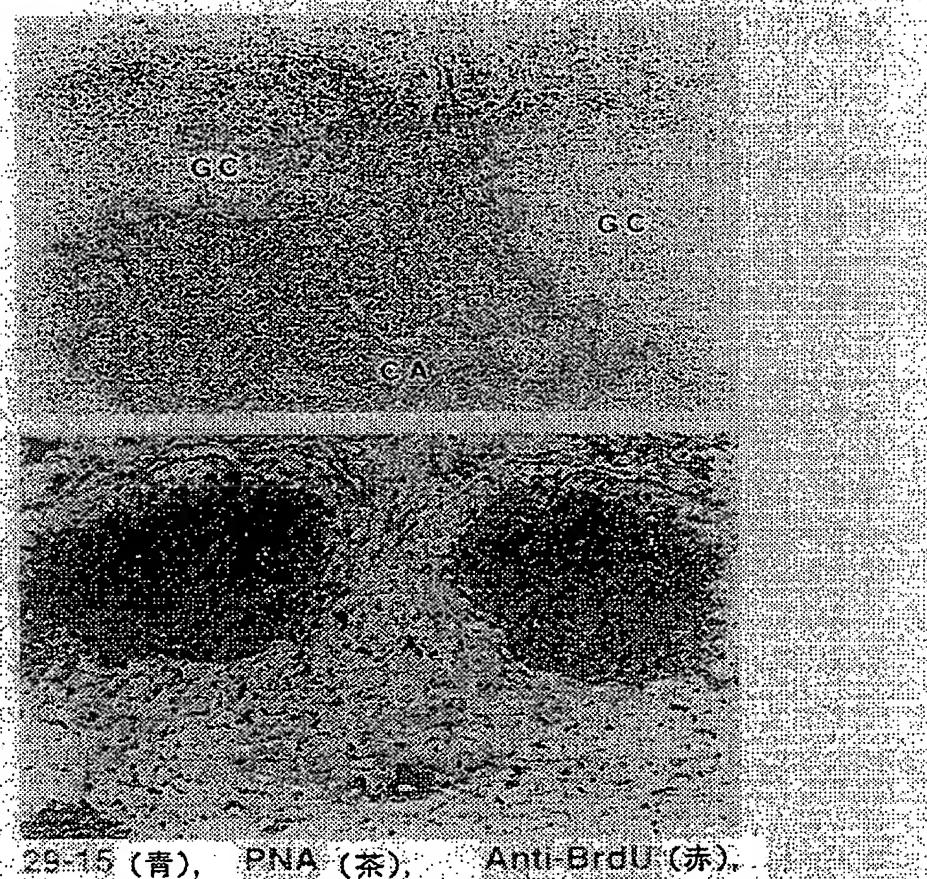
第2図



第3図

GANP antigen expressed in PNA+ cells
at the distal part of GCs

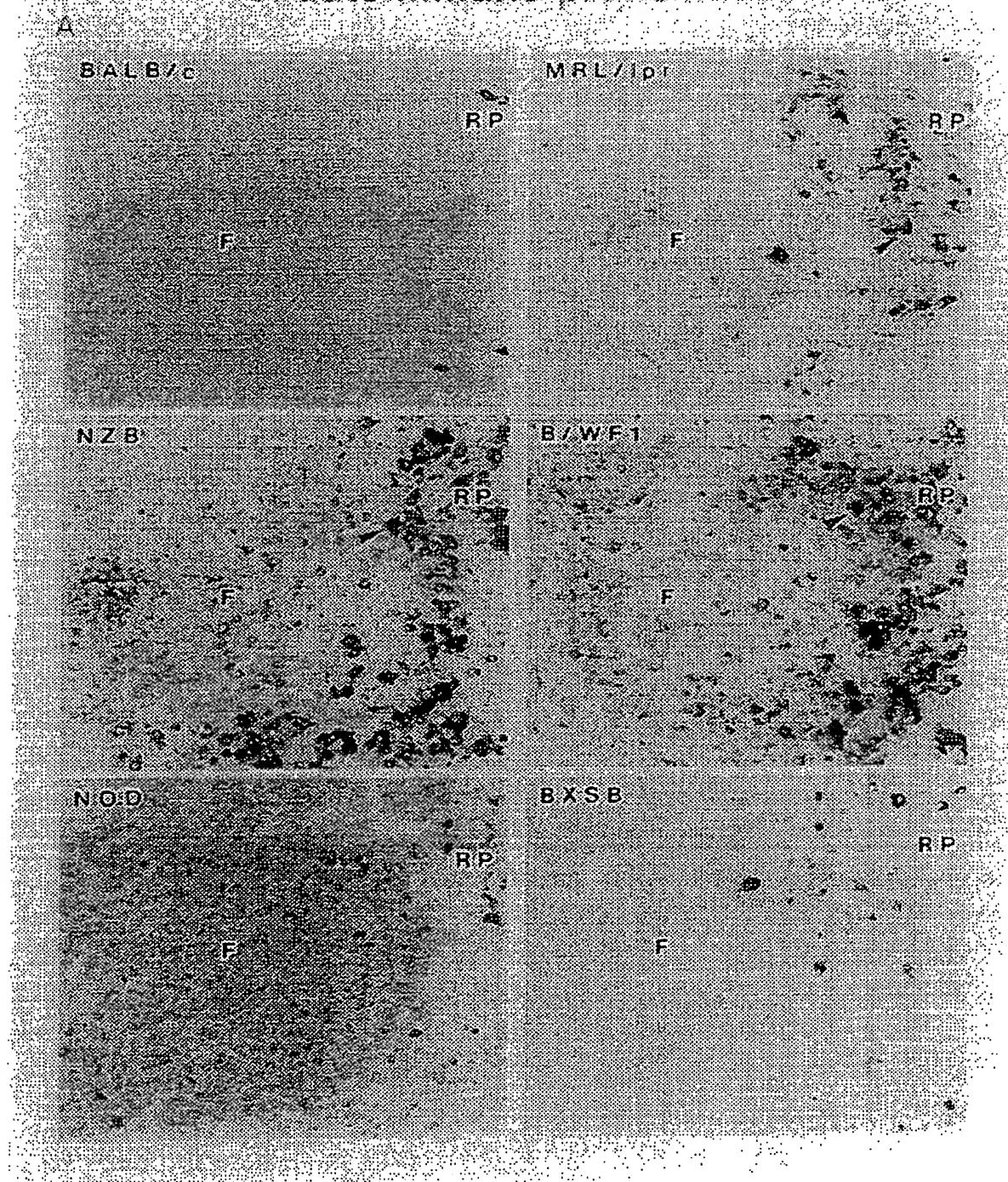
B



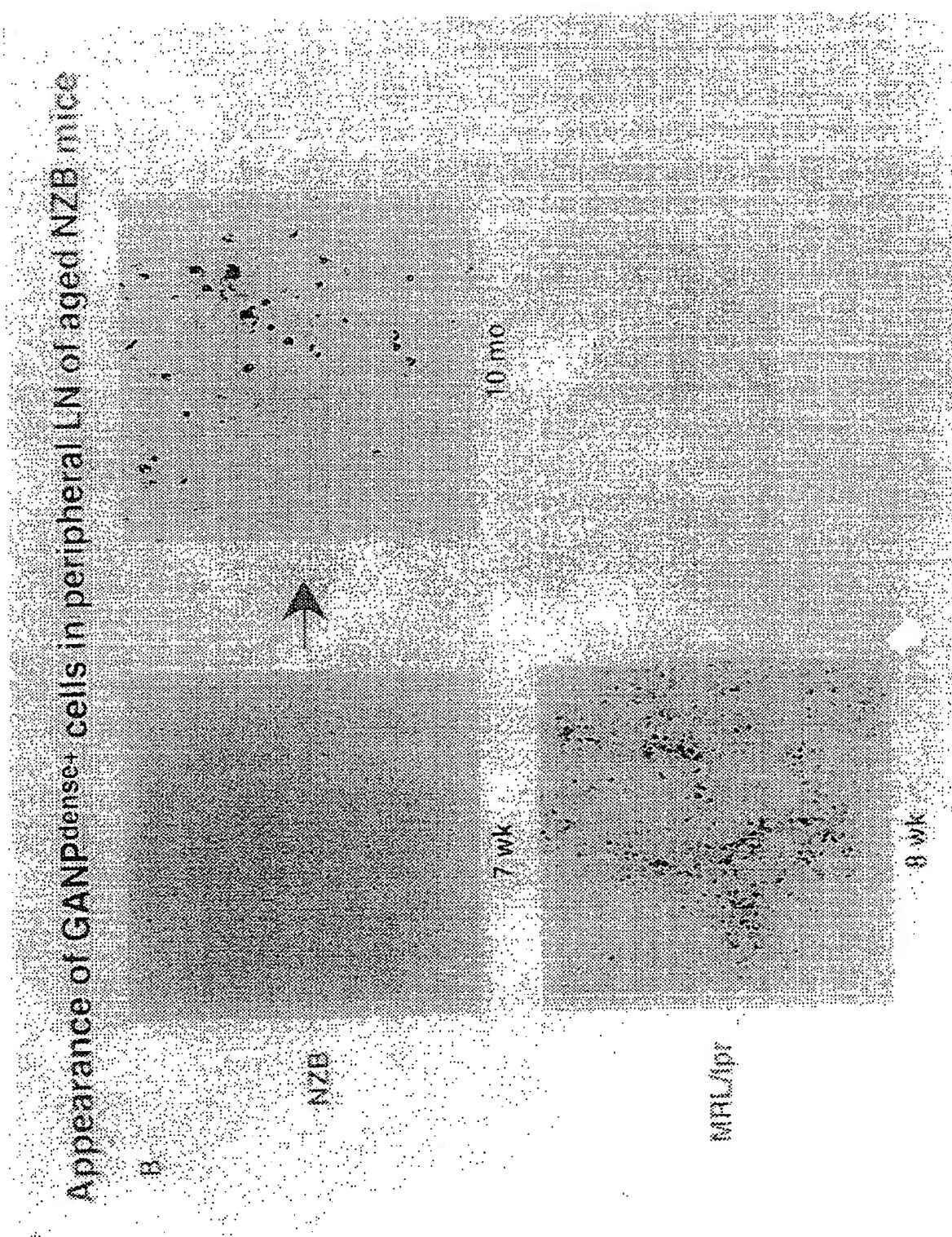
29-15 (青), PNA (茶), Anti-BrdU (赤).

第4回

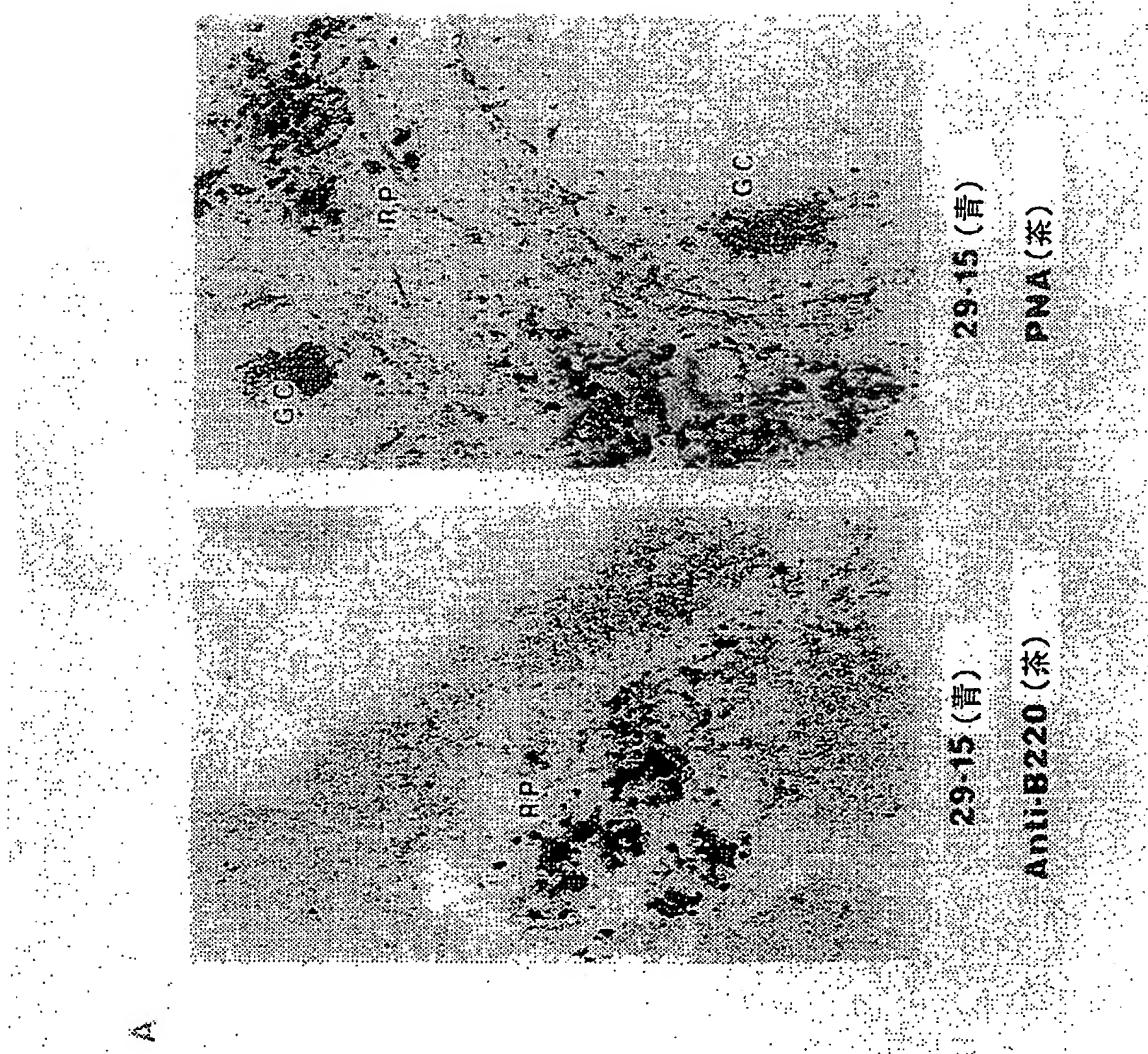
Appearance of GANP^{dense} cells in the red pulp of autoimmune-prone mice



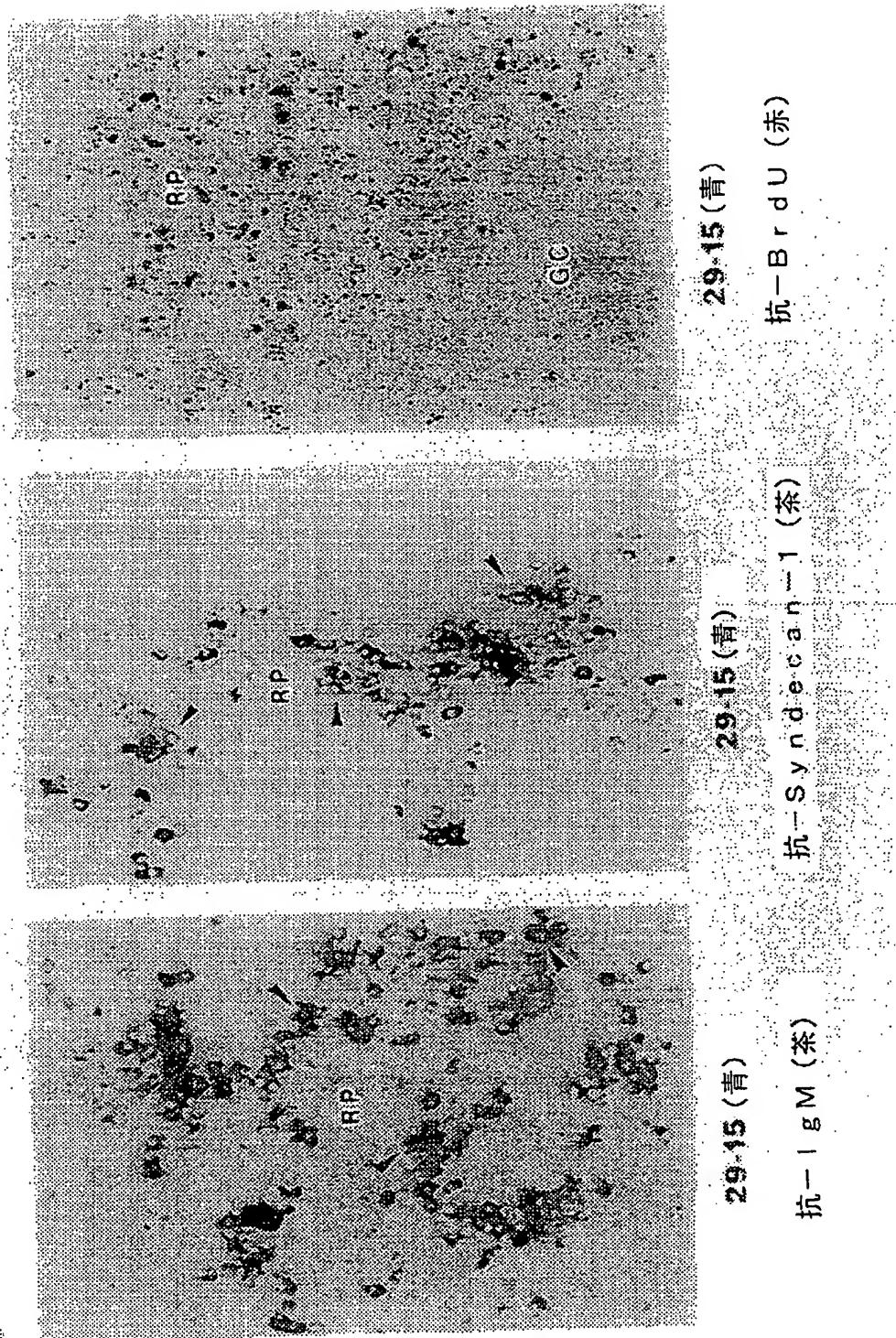
第5図



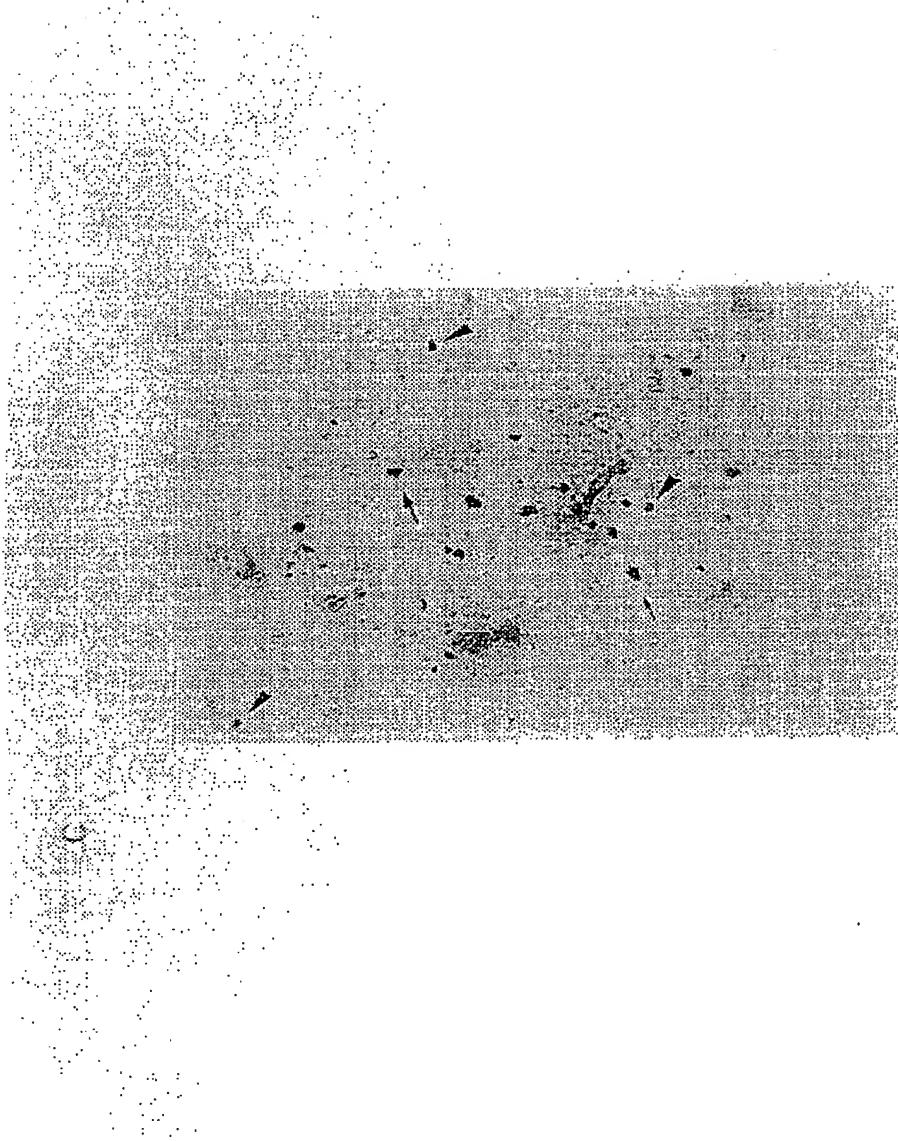
第6図



第7図



第8図



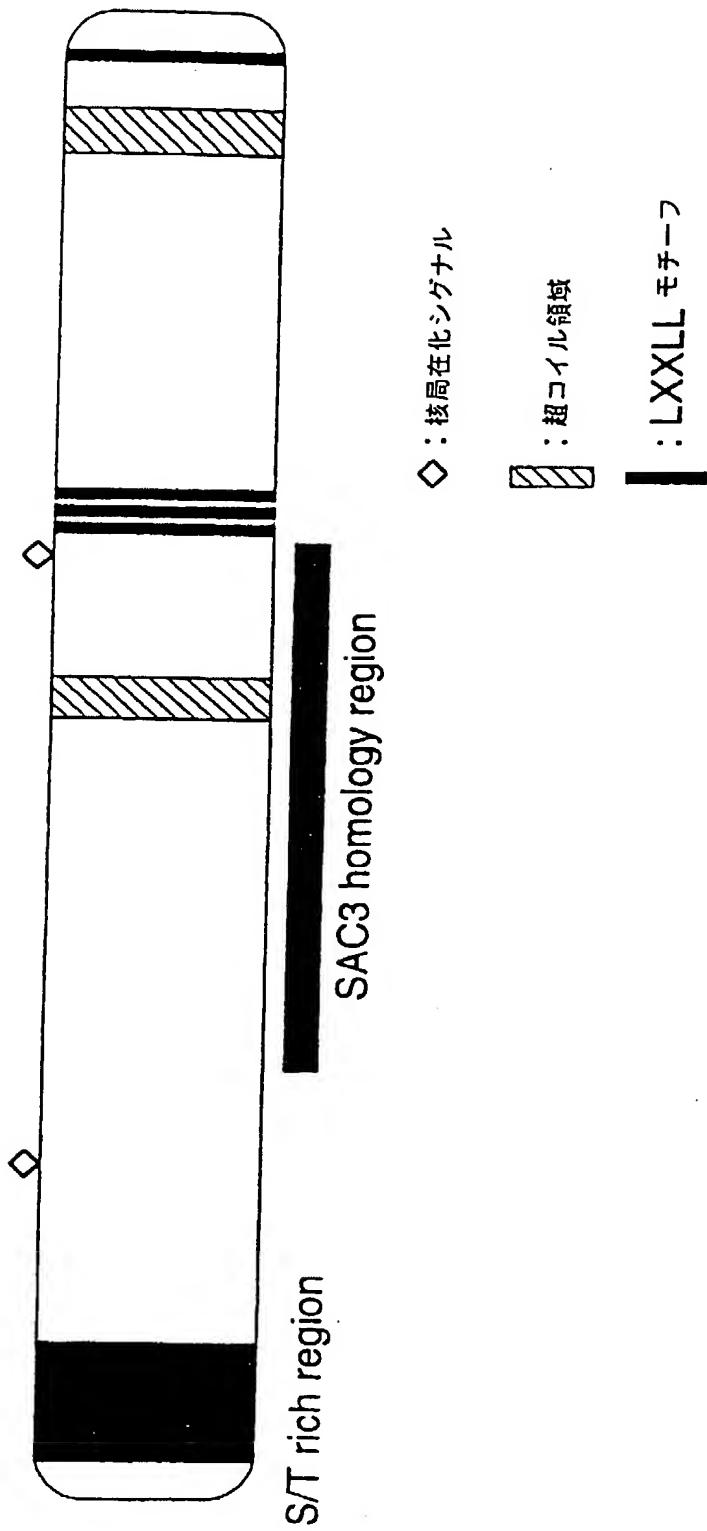
29.15(青)

PAS staining

第9図

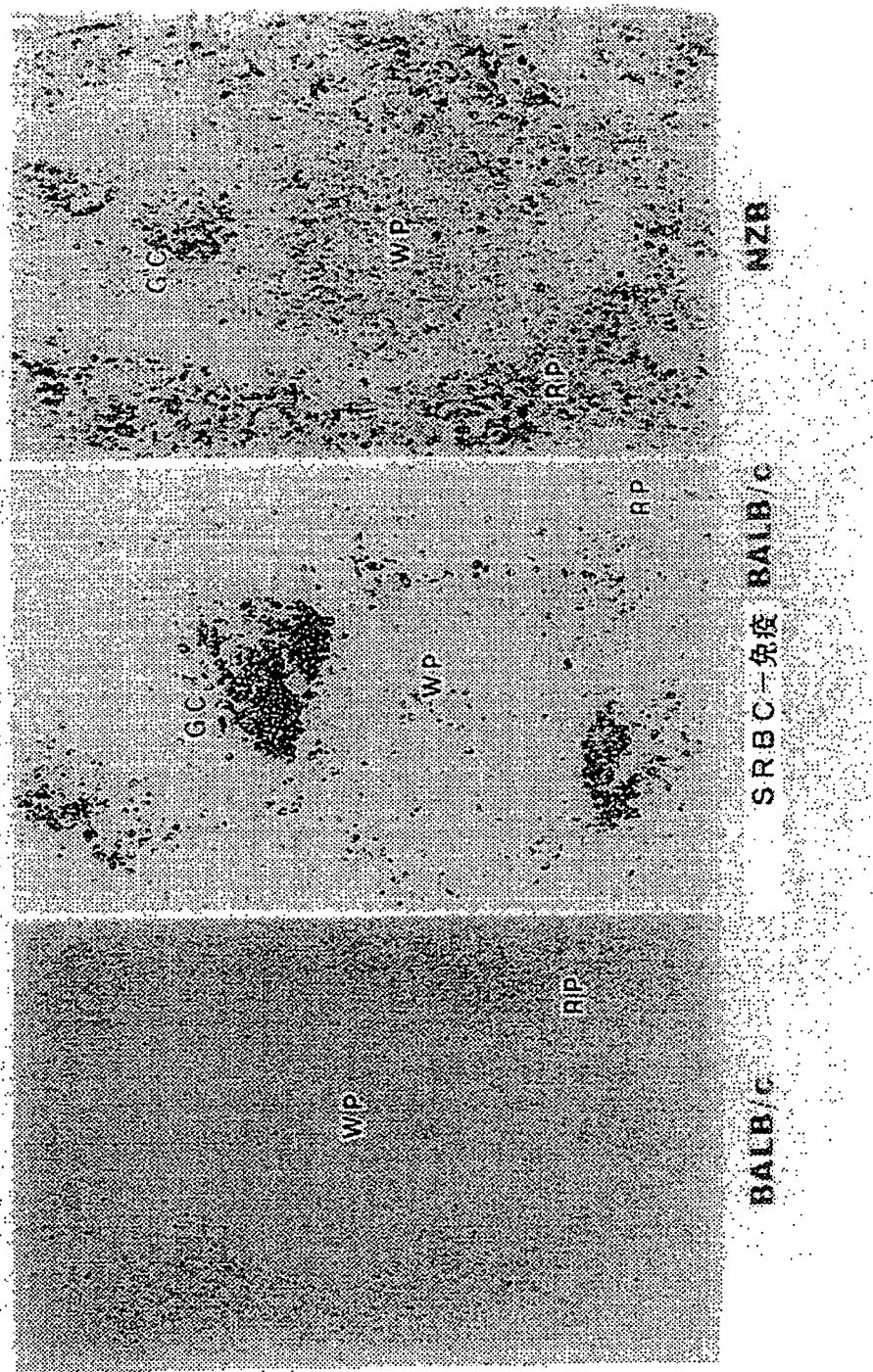
MHPVNPFGGS SPSAFAVSSS TTGTYQTAKSP FRFGQPSLFG QNSTPSKSLA⁵⁰
 FSQVPSFATP SGGSHSSSLP AFGLTQTSSV GLFSLESTP SFAATSSSSV¹⁰⁰
 PGNTAFSFKS TSSVGVFPSG ATFGPETGEV AGSGFRKTEF KFKPLENAVF¹⁵⁰
 KPIPGPESEP EKTQSQISSLG FFTFSHPVGS GSGGLTPFSF PQVTNSSLVTS²⁰⁰
 SSFIFSKPVT SNTPAFASPL SNQNVEEEKR VSTSAFGSSN SSFSTFPTAS²⁵⁰
 PGSLGEFPFA NKPSLRQGCE EAISQVEPLP TLMKGKLRKE DQDRSPRRHC³⁰⁰
 HEAAEDPDPL SRGDHPPDKR PVRLNRPRGG TLFGRTIQEV FKSNEAGRL³⁵⁰
 GSKESESGF AEPGESDHAA VPAGSQSTMV PSRLPAVTKE EEESRDEKED⁴⁰⁰
 SLRGKSVRQS KRREEWIYSL GGVSSELTA IQCKNIPDYL NDRAILEKHF⁴⁵⁰
 SKIAKVQRVF TRRSKKLAVI HFFDHASAAL ARKKKGKGLHK DVVIFWHKKK⁵⁰⁰
 ISPSKKLFPL KEKLGESEAS QGIEDSPFQH SPLSKPIVRP AAGSLLSKSS⁵⁵⁰
 PVKKPSLLKM HQFEADPDFDS GSEGSEGLGS CVSSLSTLIG TVADTSEEKY⁶⁰⁰
 RLLDQRDRIM RQARVKRTDL DKARAFVGTC PDMCPEKERY LRETRSQLSV⁶⁵⁰
 FEVVPGTDQV DHAAAKEYS RSSADQEEPL PHELRPSAVL SRTMDYLVTQ⁷⁰⁰
 IMDQKEGSLR DWYDFVWNRT RGIRKDITQQ LCDPLTVSL IEKCTRPHIH⁷⁵⁰
 CAHFMCEEPM SSFDakinne NMTKCLQSLK EMYQDRLRNKG VFCASEAEFO⁸⁰⁰
 GYNVLLNLNK GDILREVQQF HPDVRNSPEV NFAVQAFAAL NSNNFVRFFK⁸⁵⁰
 LVQSASYLNA CLLHCYFNQI RKDALRALNV AYTGSTQRST VFPLDGVVRM⁹⁰⁰
 LLFRDSEEAT NFLNYHGLTV ADGCVELNRS AFLEPEGLCK ARKSVFIGRK⁹⁵⁰
 LTVSVGVEVN GGPLPPVPRH TPVCSFNSQN KYVGESLATE LPISTQRAGG¹⁰⁰⁰
 DPAGGGRGED CEAEVDLPTL AVLPQPPPAS SATPALHVQP LAPAAAPSLL¹⁰⁵⁰
 QASTQPEVLL PKPAPVYSDS DLVQVVDeli QEALQVDCEE VSSAGAAYVA¹¹⁰⁰
 AALGVSNAAV EDLITAATTG ILRHVAEEV SMERQRLEEE KQRAEEERLK¹¹⁵⁰
 QERELMLTQL SEGLAAELTE LTVTECVWET CSQELQSAVK IDQKVRVARC¹²⁰⁰
 CEAVCAHLVD LFLAEIFQT AKETLQELQC FCKYLQRWRE AVAARKKFRR¹²⁵⁰
 QMRAFPAAAC CVDVNDRLQA LVPSAECPT EENLAKGLLD LGHAGKVGVS¹³⁰⁰
 CTRLRRLRNK TAHQIKVQHF HQQLRNAAW APLDLPSIVS EHLPMKQKRR¹³⁵⁰
 FWKLVLVLPD VEEQTPESPG RILENWLKV FTGDDSMVGD IGDNAGDIQT¹⁴⁰⁰
 LSVFNTLSSK GDQTVSVNVC IKVAHGTLSL SALDAVETQK DLLGTSGLML¹⁴⁵⁰
 LLPPKVKSEE VAEELSWLS ALLQLKQLLQ AKPFQPALPL VVLPSSRGD¹⁵⁰⁰
 SAGRAVEDGL MLQDLVSAKL ISDYIVVEIP DSVNDLQGTV KVSGAVQWLI¹⁵⁵⁰
 SGCPQALDFC CQTLVQYVED GISREFSRRF FHDRRERRLA SLPSQEPESTI¹⁶⁰⁰
 IELFNSVLQF LASVVSSEQ CDISWPVMEF AEVGGSQLLP HLHWNSPEHL¹⁶⁵⁰
 AWLKQAVLGF QLPQMDLPPP GAPWLPVCSM VIQYTSQIPS SSQTQPVQLS¹⁷⁰⁰
 QAENLLCRTY QWKKNKSLSP GQELGPSVAE IPWDDIITLC INHKLRDWTP¹⁷⁵⁰
 PRLPVTLEAL SEDGQICVYF FKNNLRKYHV PSSWEQARMQ TQRELQLSHG¹⁸⁰⁰
 RSGMRSIHPP TSTFPTPLLH VHQKGKKKEE SGREGSLSTE DLLRGASAEE¹⁸⁵⁰
 LLAQSLSSSL LEEKEENKRF EDQLQQWLSQ DSQAFTESTR LPLYLPQTLV¹⁹⁰⁰
 SFPDSIKTQT MVKTSTSPQN SGTGKQLRFS EASGSSLTEK LKLLERLIQS¹⁹⁵⁰
 SRAEEAASEL HLSALLEMVD M

第 10 図

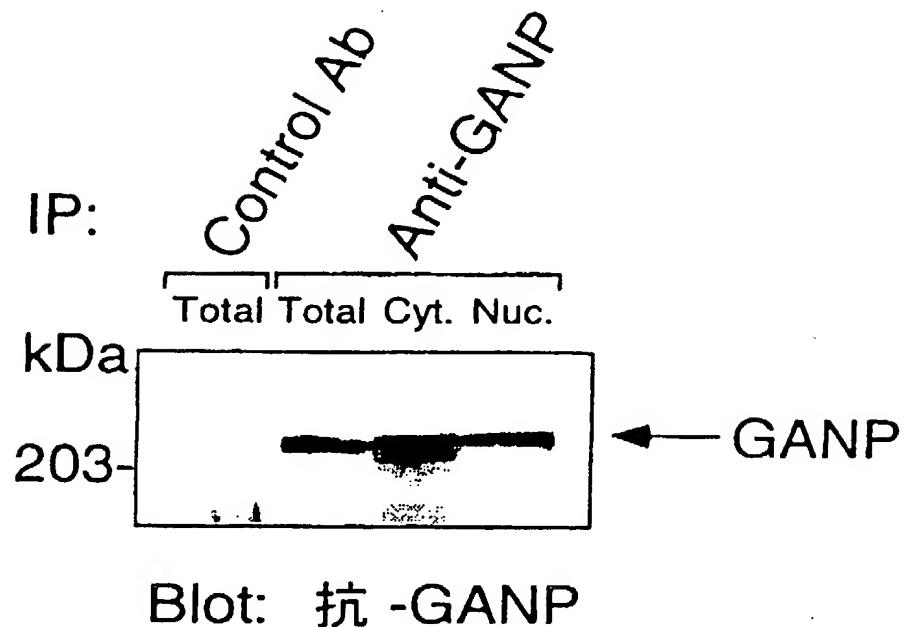


第11図

Detection of group transcript in GC by *in situ* hybridization



第 1 2 図



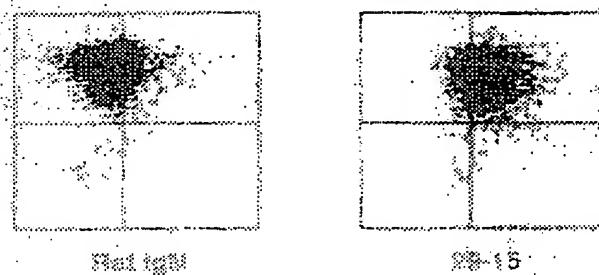
第13図

Increased expression of GANP antigen
by mitogenic stimulation *in vitro*

8

細胞質染色

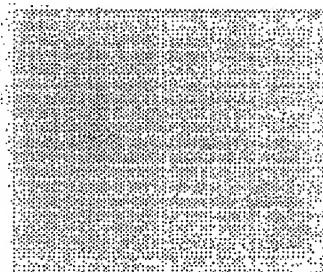
Anti-IgM + Anti-CD40 刺激 (48hr)



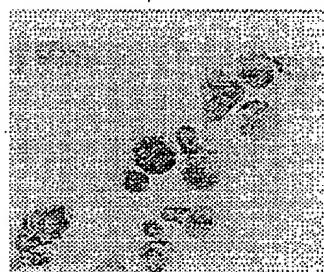
未刺激

Anti-IgM +
Anti-CD40
48hr 刺激

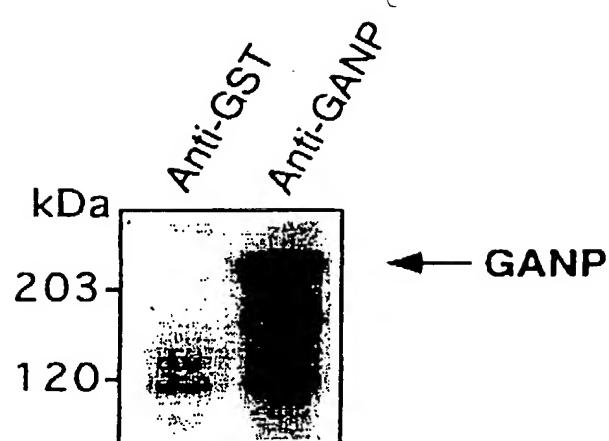
免疫染色



未刺激

Anti-IgM + Anti-CD40
48hr 刺激

第14図

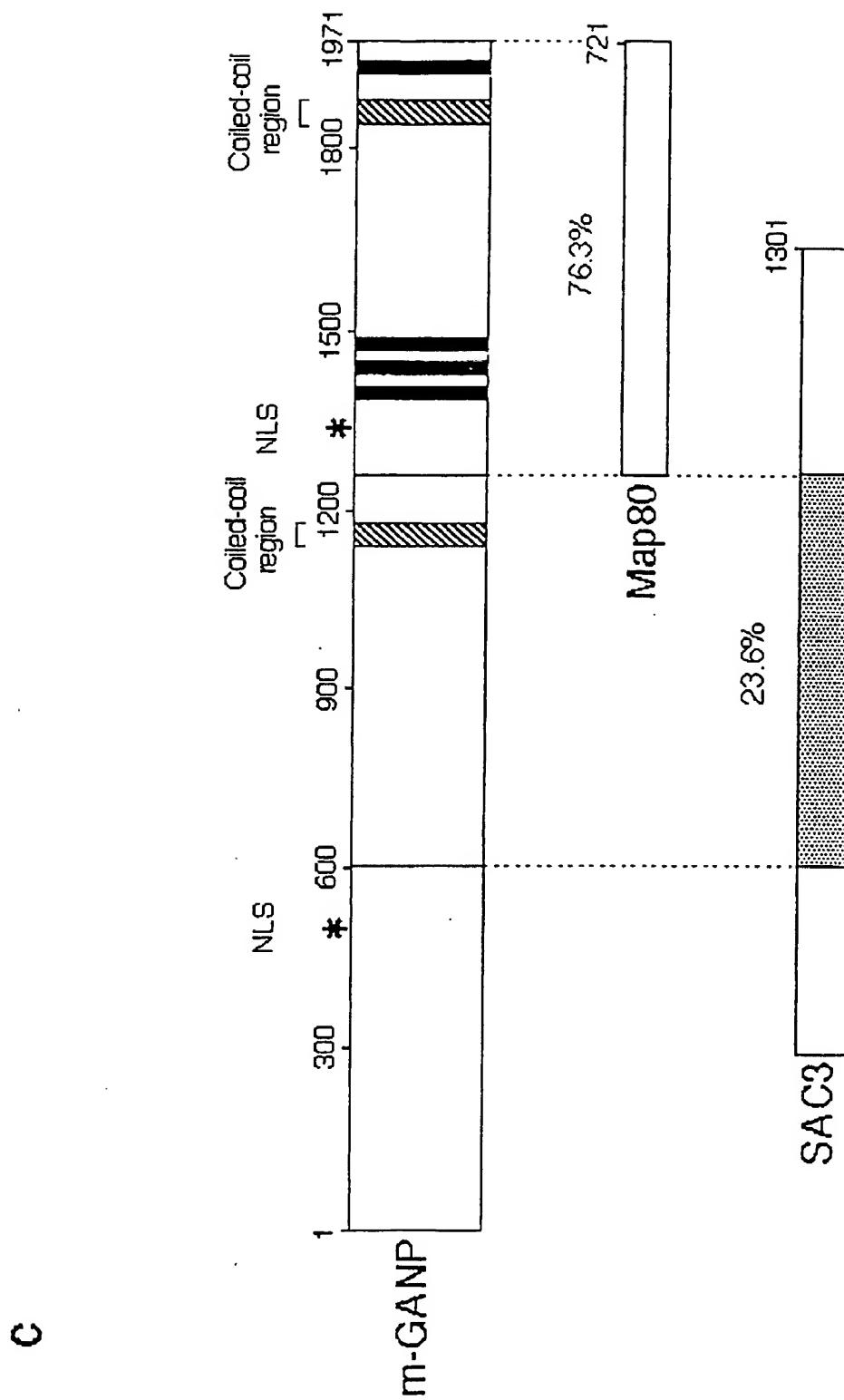
A

インビトロキナーゼアッセイ

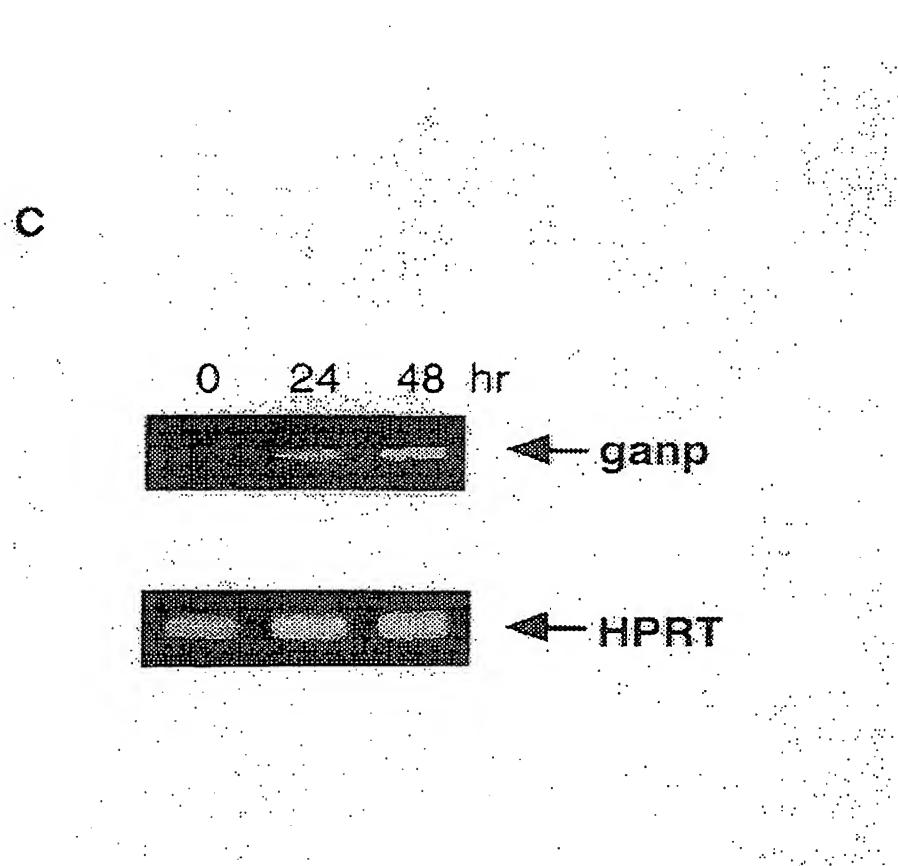
B

ホスホアミノ酸分析

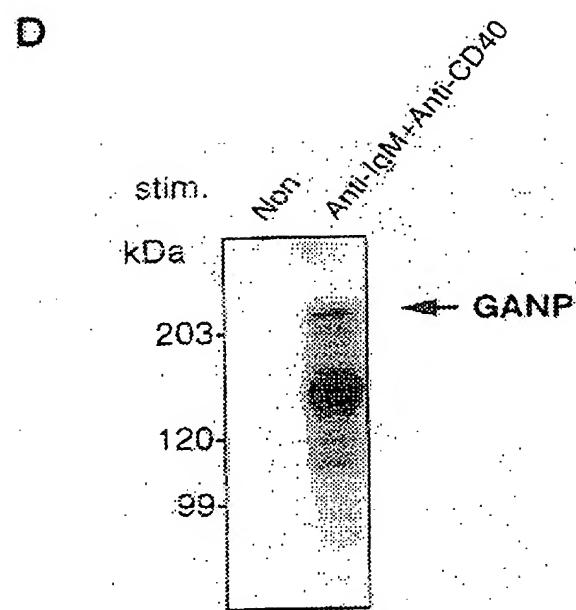
第15図



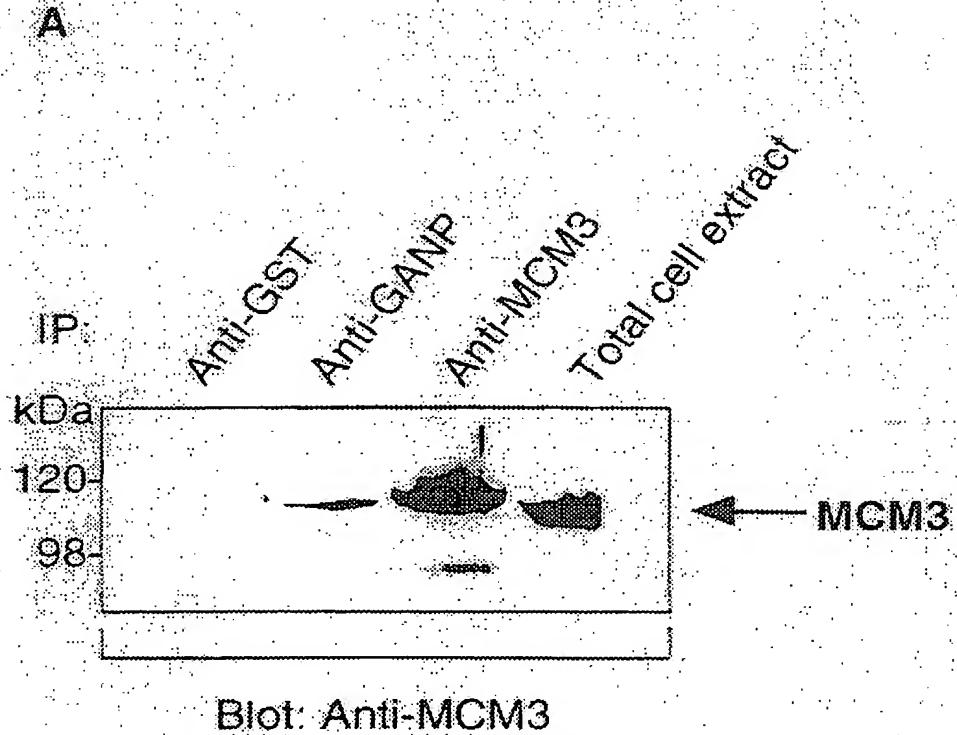
第 16 図



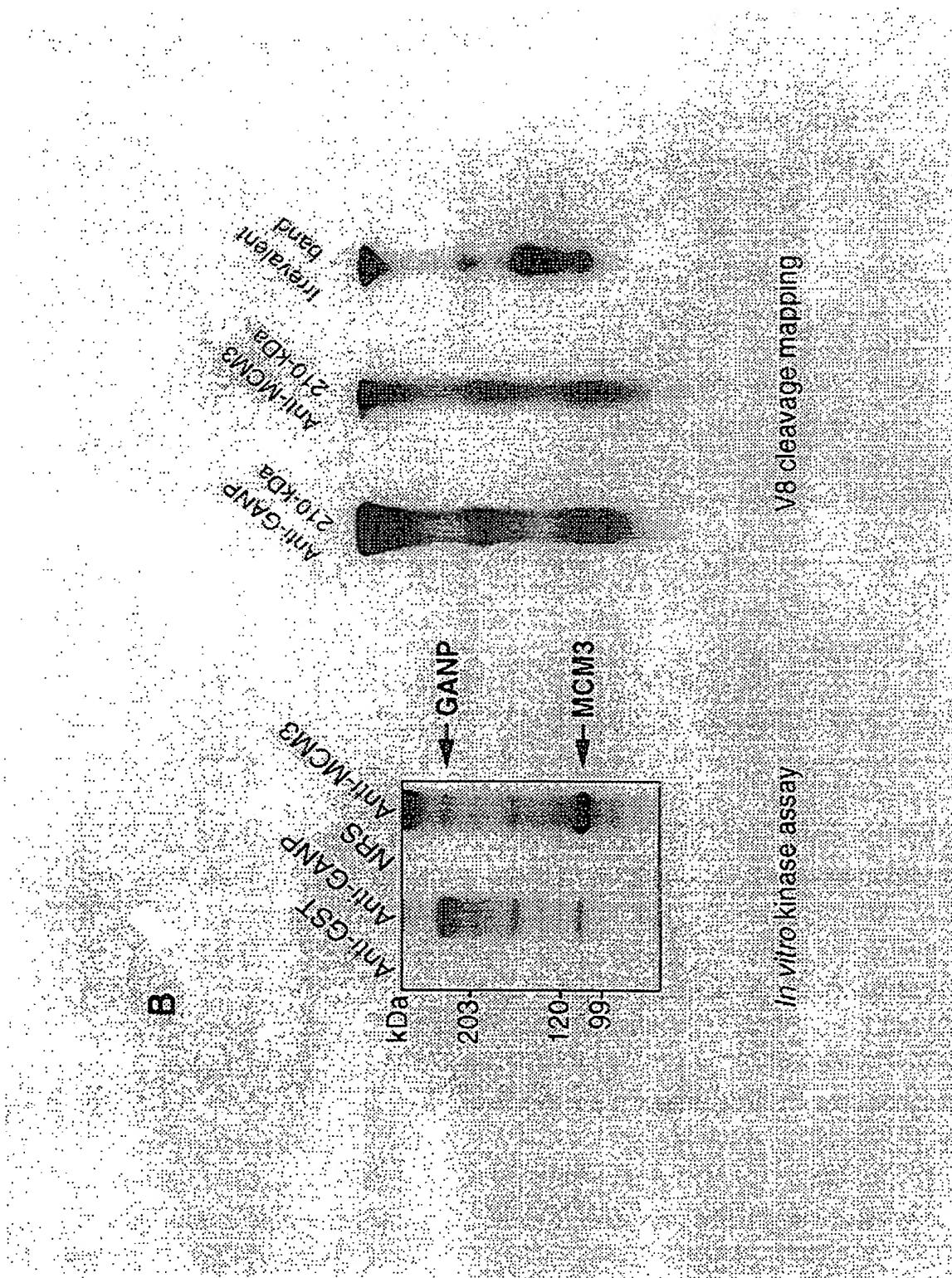
第 1 7 図



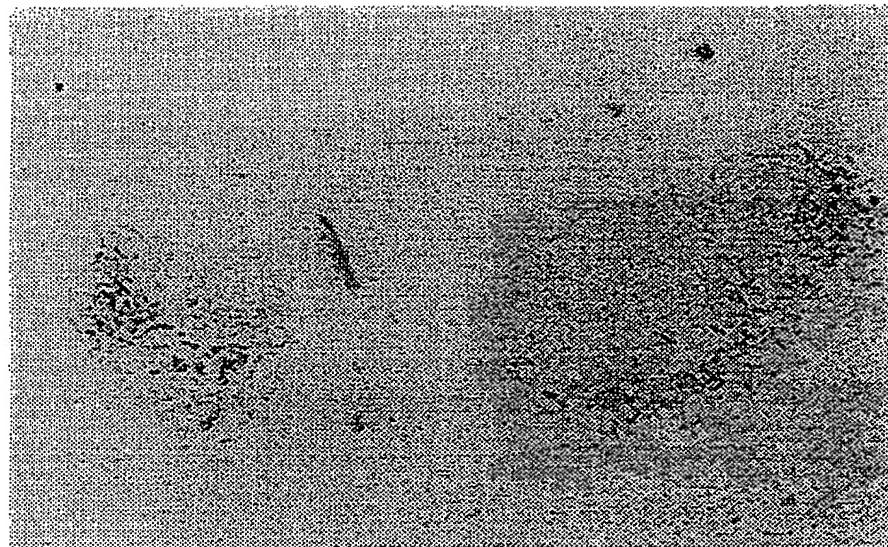
第18図



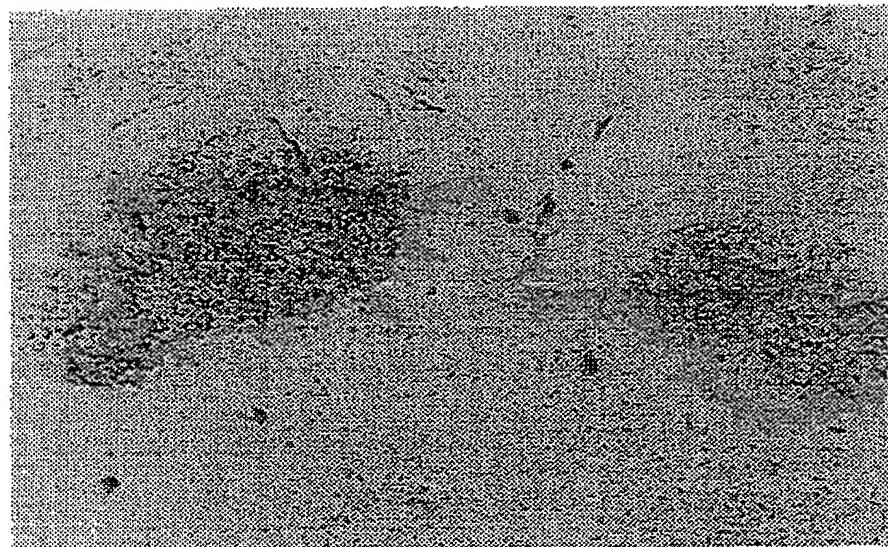
第19図



第 20 図



Anti-MCM3 (blue)
Anti-CR1 (brown)



Anti-MCM3 (blue)
PNA (brown)

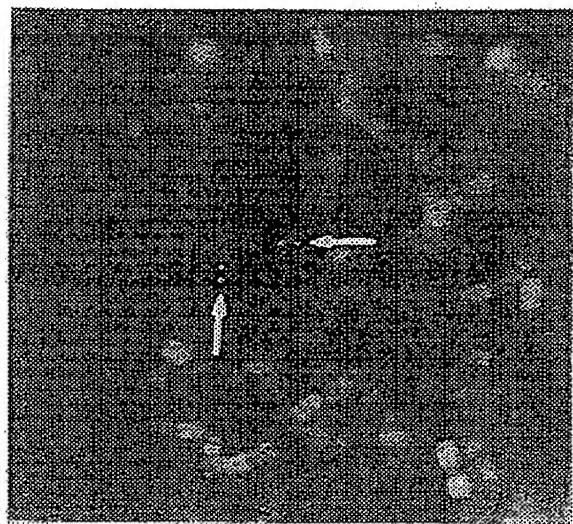
第21図 (A)

10	20	30	40	50	60
MNPTNPFSGQ	QPSAFSASSS	NVGTLPSKPP	FRFGQPSLFG	QNSTLSGKSS	GFSQVSSFFA
70	80	90	100	110	120
SSGVSHSSSV	QTLGFTQTSS	VGPFSGLEHT	STFVATSGPS	SSVVLGNTGF	SFKSPTSVGA
130	140	150	160	170	180
FPSTSAGFQE	AGEIVNSGFG	KTEFSFKPLE	NAVFKPILGA	ESEPEKTQSQ	IASGFFTFSH
190	200	210	220	230	240
PISSAPGGLA	PFSFPQVTSS	SATTSNFTFS	KPVSSNNNSLS	AFTPALSNQN	VEEEKRGPKS
250	260	270	280	290	300
IFGSSNNNSFS	SFPVSSAVLG	EPFQASKAGV	RQGCEEAVSQ	VEPLPSLMKG	LKRKEDQDRS
310	320	330	340	350	360
PRRHGHEPAE	DSDPLSRGDH	PPDKRPVRLN	RPRGGTLFGR	TIQDVFKSNK	EVGRLGNKEA
370	380	390	400	410	420
KKETGFVESAA	ESDHMAIPGG	NQSVLAPSRI	PGVNKEEETE	SREKKEDSLR	GTPARQSNRS
430	440	450	460	470	480
ESTDSLGGLS	PSEVTAIQCK	NIPDYLNDRT	ILENHFGKIA	KVQRIFTRRS	KKLAVVHFFD
490	500	510	520	530	540
HASAALARKK	GKSLHKDMAI	FWHRKKISP N	KKPFLSKEKK	PGDGEVSPST	EDAPFQHSPL
550	560	570	580	590	600
GKAAGRGTGAS	SLLNKSSPVK	KPSLLKAHQF	EGDSFDSASE	GSEGLGPCVL	SLSTLIGTV A
610	620	630	640	650	660
ETSKEKYRLL	DQRDRIMRQA	RVKRTDLDKA	RTFVGTCLDM	CPEKERYMRE	TRSQLSVFEV
670	680	690	700	710	720
VPGTDQVDHA	AAVKEYSRSS	ADQEEPLPHE	LRPLPVLSRT	MDYLVTOIMD	QKEGSLRDWY
730	740	750	760	770	780
DFVWNRTRGI	RKDITQQHL C	DPLTVSLIEK	CTRPHIHCAH	FMCEEPMSSF	DAKINNENMT
790	800	810	820	830	840
KCLQSLKEMY	QDLRNKGVFC	ASEAEFQGYN	VLLSLNKGDI	LREVQQFHPA	VRNSSEVKFA
850	860	870	880	890	900
VQAFAALNSN	NFVRFFKLVQ	SASYLNACLL	HCYFSQIRKD	ALRALNFAYT	VSTQRSTIFFP
910	920	930	940	950	960
LDGVVRMLLF	RDCEEATDFL	TCHGLTVSDG	CVELNRSAFL	EPEGLSKTRK	SVFITRKLT V
970	980	990	1000	1010	1020
SVGEIVNGGP	LPPVPRHTPV	CSFNSQNKYI	GESLAAELPV	STQRPGSDTV	GGGRGEECGV
1030	1040	1050	1060	1070	1080
EPDAPLSSL P	QSLPAPAPSP	VPLPPVLALT	PSVAPSLFQL	SVQPEPPP P	PVPMYSDEDL
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AQVVDEL I QE	ALQRDCEEVG	SAGAAYAAAA	LGVSNAA M ED	LLTAATTGIL	RHIAEEVSK
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ERERREQERQ	RAEEERLKQE	RELVLSELSQ	GLABELMERV	MMEFVRETC S	QELKNAVETD
1210	1220	1230	1240	1250	1260
QRVRVARCCE	DVCAHLVDF	LVEEIFQTAK	ETLQELQCFC	KYLQRWREAV	TARKLRRQM

第21図 (B)

1270	1280	1290	1300	1310	1320
RAFP AAPCCV	DVSD RL RALA	PSAE CPIAEE	NLARG LLDLG	HAGRL GISCT	RLR RL RNKTA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
HQM KVQH FYQ	QLL SD DV AWA S	LDL PSL VAE H	LPGR QEH VF W	KLV LV LPD VE	EQSP ESGRI
1390	1400	1410	1420	1430	1440
LAN WL KV KFM	GDE GS VDD TS	SDAG GI QT LS	LF NSL SS KG D	QM IS VN VC IK	VA HG AL SD GA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ID AV ET QK DL	LG AS GL M LLL	PP KM KSE DMA	EED VY WLS AL	LQL KQL LQ AK	PF QP AL PL VV
1510	1520	1530	1540	1550	1560
LVP SP GG DAV	EKE VE DGL ML	QDL VSA KLI S	DYT VTE I PDT	IN DL QG ST KV	LQ AV QW LV SH
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CPH SLD LCC Q	TLI QY VED GI	GHE FSG RFF H	DR RERR LG GL	AS QEP GAI IE	LF NSV LQ FLA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
SV VS SE QLCD	LS WP VT EFA E	AG GS RLL PHL	HW NAPE H LAW	LK QAV LG FQL	PQ MDL PPL GA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
PW LP VC S M VV	QY AS QI PSS R	QT QP VL QSQ V	EN LL HRT YCR	WKS KSP SPV H	GAG PSV MEIP
1750	1760	1770	1780	1790	1800
WDD LIA L CIN	HK LR DW T PPR	LP VT SE AL SE	DG QI C VY FF K	N DL K KY DV PL	SWE QAR L QT Q
1810	1820	1830	1840	1850	1860
KEL QL REG RL	AI KPF HPS AN	NF PI PLL HM H	R NW KR S TECA	QE GRIP ST ED	LM RG AS AE EL
1870	1880	1890	1900	1910	1920
LA QCL SSS LL	LE KE EN K RFE	DQ LQQ WL SED	SGA FT DLT SL	PL YLP QTL VS	LS HTIE PV MK
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TS VTT SP PQ SD	MM RE QL QL SE	AT GT CL GE RL	KH LER LI RS S	RE EE VA SEL H	LS ALL DM VDI

第22図



SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Electric Industries, Ltd.

<120> GANP protein

<130> 99266M

<160> 9

<210> 1

<211> 1971

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser Ser Pro Ser Ala Phe Ala

1 5 10 15

Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Pro Phe Arg

20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Pro Ser Lys Ser

35 40 45

Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala Thr Pro Ser Gly Gly Ser

50 55 60

His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu Thr Gln Thr Ser Ser Val

65 70 75 80

Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ser Phe Ala Ala Thr Ser

85 90 95

Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Thr Ser

100 105 110

Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr Phe Gly Pro Glu Thr Gly

115 120 125

Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr Glu Phe Lys Phe Lys Pro

130 135 140
Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro Gly Pro Glu Ser Glu Pro
145 150 155 160
Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His
165 170 175
Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Leu Thr Pro Phe Ser Phe Pro Gln
180 185 190
Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Phe Ile Phe Ser Lys Pro
195 200 205
Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser Pro Leu Ser Asn Gln Asn
210 215 220
Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser Ala Phe Gly Ser Ser Asn
225 230 235 240
Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser Leu Gly Glu
245 250 255
Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg Gln Gly Cys Glu Ala
260 265 270
Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg
275 280 285
Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Cys His Glu Ala Ala
290 295 300
Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg
305 310 315 320
Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr
325 330 335
Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Ala Gly Arg Leu Gly Ser
340 345 350

Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu Pro Gly Glu Ser Asp His
355 360 365
Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr Met Val Pro Ser Arg Leu
370 375 380
Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Glu Asp
385 390 395 400
Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp
405 410 415
Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln
420 425 430
Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys
435 440 445
His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser
450 455 460
Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu
465 470 475 480
Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp
485 490 495
His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu
500 505 510
Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe
515 520 525
Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser
530 535 540
Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met
545 550 555 560
His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu

	565	570	575
Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val			
580	585	590	
Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg			
595	600	605	
Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg			
610	615	620	
Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr			
625	630	635	640
Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly			
645	650	655	
Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser			
660	665	670	
Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala			
675	680	685	
Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln			
690	695	700	
Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr			
705	710	715	720
Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu			
725	730	735	
Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala			
740	745	750	
His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn			
755	760	765	
Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln			
770	775	780	

Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln
785 790 795 800
Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu
805 810 815
Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe
820 825 830
Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe
835 840 845
Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His
850 855 860
Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val
865 870 875 880
Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly
885 890 895
Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe
900 905 910
Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn
915 920 925
Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser
930 935 940
Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn
945 950 955 960
Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe
965 970 975
Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro
980 985 990
Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Arg Gly

995	1000	1005
Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu Pro		
1010	1015	1020
Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val Gln Pro		
1025	1030	1035
Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser Thr Gln Pro		
1040	1045	1050
Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser Asp Ser Asp Leu		
1055	1060	1065
Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Val Asp Cys		
1070	1075	1080
Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Val Ala Ala Leu Gly		
1085	1090	1095
Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly		
1100	1105	1110
Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg		
1115	1120	1125
Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu		
1130	1140	1145
Arg Glu Leu Met Leu Thr Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu		
1150	1155	1160
Thr Glu Leu Thr Val Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu		
1165	1170	1175
Leu Gln Ser Ala Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys		
1180	1185	1190
Cys Glu Ala Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu		
1195	1200	1205
1210	1215	

Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys
1220 1225 1230
Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe
1235 1240 1245
Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val
1250 1255 1260
Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Thr
1265 1270 1275 1280
Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Lys
1285 1290 1295
Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala
1300 1305 1310
His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln Leu Leu Arg Asn Ala
1315 1320 1325
Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile Val Ser Glu His Leu Pro
1330 1335 1340
Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp
1345 1350 1355 1360
Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp
1365 1370 1375
Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly
1380 1385 1390
Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser
1395 1400 1405
Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala
1410 1415 1420
His Gly Thr Leu Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys

1425 1430 1435 1440
Asp Leu Leu Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val
1445 1450 1455
Lys Ser Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu
1460 1465 1470
Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu
1475 1480 1485
Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly Arg
1490 1495 1500
Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu
1505 1510 1515 1520
Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val Asn Asp Leu
1525 1530 1535
Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp Leu Ile Ser Gly
1540 1545 1550
Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Val Gln Tyr Val
1555 1560 1565
Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg Arg Phe Phe His Asp Arg
1570 1575 1580
Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile
1585 1590 1595 1600
Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser
1605 1610 1615
Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu
1620 1625 1630
Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu
1635 1640 1645

His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln
1650 1655 1660
Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met
1665 1670 1675 1680
Val Ile Gln Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Gln Thr Gln Pro
1685 1690 1695
Val Leu Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys
1700 1705 1710
Trp Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val
1715 1720 1725
Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His Lys
1730 1735 1740
Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu
1745 1750 1755 1760
Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu Arg
1765 1770 1775
Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln Thr Gln
1780 1785 1790
Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg Ser Ile His
1795 1800 1805
Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu Leu His Val His Gln Lys
1810 1815 1820
Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu
1825 1830 1835 1840
Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu
1845 1850 1855
Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp

1860	1865	1870
Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser		
1875	1880	1885
Thr Arg Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp		
1890	1895	1900
Ser Ile Lys Thr Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn		
1905	1910	1915
Ser Gly Thr Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser		
1925	1930	1935
Leu Thr Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg		
1940	1945	1950
Ala Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met		
1955	1960	1965
Val Asp Met		
1970		
<210> 2		
<211> 6429		
<212> DNA		
<213> Mouse		
<400> 2		
gttgcgggtgc ggtggggcccg gtagaggctg cacgcagact gtgggcgagc acaagcgctg		60
gcgacagtgg ccgttatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt		120
gtctttgccg agttgctgaa ggccttcact agtcttcgct cgaaggcgtc tggtaaccta		180
gcggccggct tccggagtgt taagcatcgg ggataaaaag ctattatttc tagaccaggg		240
catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag		300
cttccccctgg caacagataa tttaaagagg agagctactt gtgtatagtc catatttt		360
gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc		413

agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag	461
act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac	509
agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca	557
aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc	605
acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct	653
tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc	701
agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act	749
ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cgg aag acg	797
gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg	845
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga	893
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc	941
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt	989
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct	1037
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca	1085
gca ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca	1133
cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc	1181
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc	1229
atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga	1277
cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac	1325
cat ccc cca gat aaa cgg cca gtc cgc ctc aac aga ccc cgg gga ggt	1373
act ttg ttt ggc cgg aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag	1421
gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa	1469
cct ggg gaa agt gac cac gcg gcc gtc cca gga ggg agt cag tcc acc	1517
atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa agt	1565
aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt	1613
aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta	1661
gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac	1709

aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cgg	1757
gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac	1805
cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag	1853
gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa	1901
ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc	1949
atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg	1997
agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag	2045
ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct	2093
gga tct gag ggc tcc gag ggc ctt ggt tct tgc gtg tca tct ctt agc	2141
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt	2189
ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg	2237
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt	2285
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg	2333
ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg	2381
aag gag tac agc cgg tcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat	2429
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg	2477
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cgg gat tgg tat gac	2525
ttc gtg tgg aac cgc acc cgg ggt ata cgg aag gac ata aca cag cag	2573
cac ctc tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga	2621
ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc	2669
ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt	2717
ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc	2765
agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctc aac aaa	2813
gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac	2861
tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc	2909
aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg	2957
aat gcg tgc ctg tta cac tgt tac ttt aat cag atc cgc aag gat gcc	3005

ctc	cgg	gca	ctc	aat	gtt	gct	tat	act	gta	agc	aca	cag	cgc	tct	acc	3053
gtc	ttc	ccc	ctg	gat	ggt	gtc	gtc	cgc	atg	ctg	ctg	ttc	aga	gat	agt	3101
gaa	gag	gcg	aca	aac	ttc	ctc	aat	tac	cat	ggc	ctc	act	gta	gct	gat	3149
ggc	tgt	gtt	gag	ctg	aat	cgg	tcg	gca	ttc	ttg	gaa	ccg	gag	gga	tta	3197
tgc	aag	gcc	agg	aag	tca	gtg	ttt	att	ggc	cgg	aag	ctg	acg	gtg	tca	3245
gtt	ggg	gaa	gtt	gtg	aat	gga	ggg	ccg	ttg	ccc	cct	gtt	cct	cgc	cat	3293
aca	cct	gtg	tgc	agc	ttc	aac	tcc	cag	aat	aag	tac	gtt	gga	gag	agc	3341
ctg	gct	acg	gag	ctg	ccc	atc	agc	act	cag	aga	gct	ggt	gga	gac	cca	3389
gca	ggt	ggt	ggc	aga	gga	gag	gac	tgt	gag	gca	gag	gtg	gac	ttg	cca	3437
aca	ttg	gcg	gtc	ctc	cca	cag	ccg	cct	cct	gca	tcc	tca	gcc	acg	ccg	3485
gcg	ctt	cat	gtc	cag	cca	ctg	gcc	cca	gca	gca	ccc	agc	ctt	ctc	cag	3533
cag	gcc	tcc	acg	cag	cct	gag	gtg	ctg	ctt	cca	aag	cct	gcg	cct	gtg	3581
tac	tct	gac	tcg	gac	ctg	gta	cag	gtg	gtg	gac	gag	ctc	atc	cag	gag	3629
gct	ctg	caa	gtg	gac	tgt	gag	gaa	gtc	agc	tcc	gct	ggg	gca	gcc	tac	3677
gta	gcc	gca	gct	ctg	ggc	gtt	tcc	aat	gct	gct	gtg	gag	gat	ctg	att	3725
act	gct	gcf	acc	acg	ggc	att	ctg	agg	cac	gtt	gcc	gct	gag	gaa	gtt	3773
tcc	atg	gaa	agg	cag	aga	cta	gag	gaa	gag	aag	caa	cga	gct	gag	gag	3821
gaa	cgg	ttg	aag	caa	gag	aga	gaa	ctg	atg	tta	act	cag	ctg	agc	gag	3869
ggt	ctg	gcc	gca	gag	ctg	aca	gaa	ctc	acg	gtg	aca	gag	tgt	gtg	tgg	3917
gaa	acc	tgc	tct	cag	gag	cta	cag	agt	gca	gta	aaa	ata	gac	cag	aag	3965
gtc	cgt	gtg	gcc	cgc	tgt	tgt	gaa	gcc	gtc	tgt	gca	cac	ctg	gtg	gat	4013
ttg	ttt	ctt	gct	gag	gaa	att	ttc	cag	act	gca	aaa	gag	aca	ctc	cag	4061
gaa	ctc	cag	tgt	ttc	tgc	aag	tat	cta	caa	cgg	tgg	agg	gag	gct	gtt	4109
gca	gct	cgg	aag	aaa	ttc	cgg	cgt	cag	atg	cgg	gcc	ttc	cct	gca	cgc	4157
cca	tgc	tgt	gtg	gat	gtg	aat	gac	cgg	ctg	cag	gca	cta	gtg	ccc	agc	4205
gca	gag	tgc	ccc	att	act	gag	gag	aac	ctg	gcc	aag	ggt	ctt	ttg	gac	4253
ctg	ggc	cac	gca	ggc	aaa	gta	ggc	gtc	tcc	tgt	acc	agg	ttg	agg	cgg	4301

ctt aga aac aag aca gct cac cag ata aag gtc cag cac ttc cac cag	4349
cag ctg ctg agg aat gct gca tgg gca cct ctg gac ctg cca tcc att	4397
gtg tct gag cac ctc ccc atg aag cag aag cga agg ttt tgg aaa ctg	4445
gtg ctg gtg ttg cct gat gtg gaa gag cag act cca gag agt cct ggc	4493
aga ata cta gaa aac tgg cta aag gtc aaa ttc aca gga gat gac agc	4541
atg gtg ggt gac ata gga gat aat gct ggt gat atc cag acc ctc tca	4589
gtc ttt aat aca ctt agt agt aaa ggg gat caa aca gtt tct gtc aac	4637
gtg tgt ata aag gtg gct cat ggc acc ctt agt gac agt gcc ctt gat	4685
gct gtg gag acc cag aag gac ctg ttg gga acc agt ggg ctc atg ctg	4733
ctg ctt ccc ccg aaa gtg aag agt gag gag gtg gca gag gag gaa ctg	4781
tcc tgg ctg tcg gct tta ctg cag ctc aag cag ctt ctg cag gcc aag	4829
ccc ttc cag cct gcc ctg ccg ctg gtg gtc ctc gtg ccc agc tcc aga	4877
ggg gac tcc gcg ggg agg gca gta gag gac ggt ctg atg tta cag gat	4925
ttg gtt tca gcc aag ctg att tcc gat tac att gtt gtt gag att cct	4973
gac tct gtt aat gat tta caa ggc aca gtg aag gtt tct gga gca gtc	5021
cag tgg ctg atc tcc gga tgt cct caa gcc cta gac ctt tgc tgc cag	5069
acc ctt gtt cag tat gtt gag gat ggg atc agc cgc gag ttc agc cgt	5117
cgg ttt ttc cac gac agg aga gag agg cgc ctg gct agc ctg ccc tcc	5165
cag gag cct agc acc att att gag ttg ttc aac agt gtg ctg cag ttc	5213
ctg gcc tct gtg gta tcc tct gag cag ctg tgt gac atc tcc tgg cct	5261
gtc atg gaa ttt gcc gaa gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg	5309
cac tgg aac tca cca gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt	5357
ggg ttc cag ctt cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg	5405
ctc cct gtg tgt tcc atg gtc att cag tac acc tcc cag att ccc agc	5453
tca agc cag aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gcg gag aac ctg ctg	5501
tgc aga aca tac cag aag tgg aag aac aag agc ctc tct cca ggc cag	5549
gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag atc ccg tgg gat gac atc atc acc	5597

tta tgc atc aat cat aag ctg agg gac tgg aca ccc ccc agg ctc cct	5645
gtc aca tta gag gcg ctg agt gaa gat ggt caa ata tgt gtg tat ttt	5693
ttc aaa aac ctt tta aga aaa tac cac gtt ccc tcg tca tgg gaa cag	5741
gcc aga atg cag acg cag cg ^g gaa ctg cag ctg agt cat gga cgt tcg	5789
gg ^g atg agg tcc atc cat cct cct aca agc act ttt cct act cca ttg	5837
ctt cat gta cac cag aaa gg ^g aag aaa aag gaa gag agt ggc cga gag	5885
gg ^g agc ctc agt aca gag gac ctc ctg cg ^g gg ^g gct tct gca gaa gag	5933
ctc ctg gca cag agt ctg tcc agc agt ctt ctg gaa gag aag gaa gag	5981
aac aag agg ttt gaa gat caa ctt cag cag tgg tta tcg caa gac tca	6029
cag gca ttc aca gag tca act cg ^g ctt cct ctc tac ctc cct cag acg	6077
cta gtg tcc ttt cct gat tct atc aaa act cag acc atg gtg aaa aca	6125
tct aca agt cct cag aat tca gga aca gga aag cag ttg agg ttc tca	6173
gag gca tcc ggt tca tcc ctg acg gaa aag ctg aag ctc ctg gaa agg	6221
ctg atc cag agc tca agg gc ^g gaa gca gc ^g tcc gag ctg cac ctc	6269
tct gca ctg ctg gag atg gtg gac atg tag ctgtctgacg ggagacggat	6319
ctcttaattca taatgc ^{ttt} tctgtattca attgtgttat agatgtgtt ggaaatgtga	6379
ctattaatta tgcaaataaa ct ^{ttt} gaat cattccaaaa aaaaaaccat	6429

<210> 3

<211> 1980

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Asn Pro Thr Asn Pro Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asn Val Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg

20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys

35 40 45
Ser Ser Gly Phe Ser Gln Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val
50 55 60
Ser His Ser Ser Ser Val Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser
65 70 75 80
Val Gly Pro Phe Ser Gly Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr
85 90 95
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe
100 105 110
Lys Ser Pro Thr Ser Val Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Gln Glu Ala Gly Glu Ile Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe
130 135 140
Ser Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala
145 150 155 160
Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe
165 170 175
Thr Phe Ser His Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe
180 185 190
Ser Phe Pro Gln Val Thr Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr
195 200 205
Phe Ser Lys Pro Val Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro
210 215 220
Ala Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser
225 230 235 240
Ile Phe Gly Ser Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser
245 250 255

Ala Val Leu Gly Glu Pro Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln
260 265 270
Gly Cys Glu Glu Ala Val Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met
275 280 285
Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His
290 295 300
Gly His Glu Pro Ala Glu Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His
305 310 315 320
Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr
325 330 335
Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val
340 345 350
Gly Arg Leu Gly Asn Lys Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu
355 360 365
Ser Ala Glu Ser Asp His Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val
370 375 380
Leu Ala Pro Ser Arg Ile Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu
385 390 395 400
Ser Arg Glu Lys Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln
405 410 415
Ser Asn Arg Ser Glu Ser Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser
420 425 430
Glu Val Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp
435 440 445
Arg Thr Ile Leu Glu Asn His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg
450 455 460
Ile Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp

465	470	475	480
His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys			
485	490	495	
Asp Met Ala Ile Phe Trp His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys			
500	505	510	
Pro Phe Ser Leu Lys Glu Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro			
515	520	525	
Ser Thr Glu Asp Ala Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala			
530	535	540	
Gly Arg Thr Gly Ala Ser Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys			
545	550	555	560
Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp			
565	570	575	
Ser Ala Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu			
580	585	590	
Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg			
595	600	605	
Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg			
610	615	620	
Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met			
625	630	635	640
Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser			
645	650	655	
Val Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala			
660	665	670	
Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro			
675	680	685	

His Glu Leu Arg Pro Leu Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu
690 695 700
Val Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr
705 710 715 720
Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln
725 730 735
Gln His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr
740 745 750
Arg Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser
755 760 765
Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln
770 775 780
Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys
785 790 795 800
Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn
805 810 815
Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg
820 825 830
Asn Ser Ser Glu Val Lys Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn
835 840 845
Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr
850 855 860
Leu Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp
865 870 875 880
Ala Leu Arg Ala Leu Asn Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser
885 890 895
Thr Ile Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp

900 905 910
Cys Glu Glu Ala Thr Asp Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser
915 920 925
Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly
930 935 940
Leu Ser Lys Thr Arg Lys Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val
945 950 955 960
Ser Val Gly Glu Ile Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg
965 970 975
His Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu
980 985 990
Ser Leu Ala Ala Glu Leu Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp
995 1000 1005
Thr Val Gly Gly Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp Ala
1010 1015 1020
Pro Leu Ser Ser Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro
1025 1030 1035 1040
Val Pro Leu Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val Ala Pro Ser
1045 1050 1055
Leu Phe Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro Glu Pro Val
1060 1065 1070
Pro Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val Val Asp Glu Leu Ile
1075 1080 1085
Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu Val Gly Ser Ala Gly Ala
1090 1095 1100
Ala Tyr Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Met Glu Asp
1105 1110 1115 1120

Leu Leu Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu Arg His Ile Ala Ala Glu
1125 1130 1135
Glu Val Ser Lys Glu Arg Arg Glu Gln Glu Arg Gln Arg Ala
1140 1145 1150
Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Arg Glu Leu Val Leu Ser Glu Leu
1155 1160 1165
Ser Gln Gly Leu Ala Val Glu Leu Met Glu Arg Val Met Met Glu Phe
1170 1175 1180
Val Arg Glu Thr Cys Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ala Val Glu Thr Asp
1185 1190 1195 1200
Gln Arg Val Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Asp Val Cys Ala His Leu
1205 1210 1215
Val Asp Leu Phe Leu Val Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr
1220 1225 1230
Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu
1235 1240 1245
Ala Val Thr Ala Arg Lys Lys Leu Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro
1250 1255 1260
Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Ser Asp Arg Leu Arg Ala Leu Ala
1265 1270 1275 1280
Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Ala Glu Glu Asn Leu Ala Arg Gly Leu
1285 1290 1295
Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Arg Leu Gly Ile Ser Cys Thr Arg Leu
1300 1305 1310
Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Met Lys Val Gln His Phe
1315 1320 1325
Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Asp Val Ala Trp Ala Ser Leu Asp Leu Pro

1330 1335 1340
Ser Leu Val Ala Glu His Leu Pro Gly Arg Gln Glu His Val Phe Trp
1345 1350 1355 1360
Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu Glu Gln Ser Pro Glu Ser
 1365 1370 1375
Cys Gly Arg Ile Leu Ala Asn Trp Leu Lys Val Lys Phe Met Gly Asp
 1380 1385 1390
Glu Gly Ser Val Asp Asp Thr Ser Ser Asp Ala Gly Gly Ile Gln Thr
 1395 1400 1405
Leu Ser Leu Phe Asn Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln Met Ile Ser
 1410 1415 1420
Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala
1425 1430 1435 1440
Ile Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu
 1445 1450 1455
Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu
 1460 1465 1470
Asp Val Tyr Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln
 1475 1480 1485
Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser
 1490 1495 1500
Pro Gly Gly Asp Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu Met Leu
1505 1510 1515 1520
Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr Val Thr Glu
 1525 1530 1535
Ile Pro Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr Lys Val Leu Gln
 1540 1545 1550

Ala Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His Ser Leu Asp Leu Cys
1555 1560 1565
Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Gly His Glu Phe
1570 1575 1580
Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Gly Gly Leu
1585 1590 1595 1600
Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu
1605 1610 1615
Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Leu Ser
1620 1625 1630
Trp Pro Val Thr Glu Phe Ala Glu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Pro
1635 1640 1645
His Leu His Trp Asn Ala Pro Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala
1650 1655 1660
Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala
1665 1670 1675 1680
Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile
1685 1690 1695
Pro Ser Ser Arg Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn
1700 1705 1710
Leu Leu His Arg Thr Tyr Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro
1715 1720 1725
Val His Gly Ala Gly Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp Leu
1730 1735 1740
Ile Ala Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg
1745 1750 1755 1760
Leu Pro Val Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val

1765 1770 1775
Tyr Phe Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val Pro Leu Ser Trp
1780 1785 1790
Glu Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu Gln Leu Arg Glu Gly
1795 1800 1805
Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser Ala Asn Asn Phe Pro Ile
1810 1815 1820
Pro Leu Leu His Met His Arg Asn Trp Lys Arg Ser Thr Glu Cys Ala
1825 1830 1835 1840
Gln Glu Gly Arg Ile Pro Ser Thr Glu Asp Leu Met Arg Gly Ala Ser
1845 1850 1855
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Cys Leu Ser Ser Leu Leu Leu Glu
1860 1865 1870
Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser
1875 1880 1885
Glu Asp Ser Gly Ala Phe Thr Asp Leu Thr Ser Leu Pro Leu Tyr Leu
1890 1895 1900
Pro Gln Thr Leu Val Ser Leu Ser His Thr Ile Glu Pro Val Met Lys
1905 1910 1915 1920
Thr Ser Val Thr Thr Ser Pro Gln Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu
1925 1930 1935
Gln Leu Ser Glu Ala Thr Gly Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His
1940 1945 1950
Leu Glu Arg Leu Ile Arg Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu
1955 1960 1965
Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Asp Met Val Asp Ile
1970 1975 1980

<210> 4

<211> 6114

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

gtaatactta attaccccttct aataattggaa gcagaag atg aac cca act aat	52
cct ttc agt ggg cag cag cct agt gct ttt tcg gcg tct tct agt aat	100
gta gga aca ctt cca tct aag ccg cca ttt cga ttt ggt caa cct tct	148
ctt ttt gga caa aac agt acc tta tct ggg aag agc tcg gga ttt tca	196
cag gta tcc agc ttt cca gcg tct tct gga gta agt cat tcc tct tca	244
gtg caa aca tta ggg ttc acc caa acc tca agt gtt gga ccc ttt tct	292
gga ctt gag cac act tcc acc ttt gtg gct acc tct ggg cct tca agt	340
tca tct gtg ctg gga aac aca gga ttt agt ttt aaa tca ccc acc agt	388
gtt ggg gct ttc cca agc act tct gct ttt gga caa gaa gct gga gaa	436
ata gtg aac tct ggt ttt ggg aaa aca gaa ttc agc ttt aaa cct ctg	484
gaa aat gca gtg ttc aaa cca ata ctg ggg gct gaa tct gag cca gag	532
aaa acc cag agc caa att gct tct ggg ttt ttt aca ttt tcc cac cca	580
att agt agt gca cct gga ggc ctg gcc cct ttc tct ttt cct caa gta	628
aca agt agt tca gct acc act tca aat ttt acc ttt tca aaa cct gtt	676
agt agt aat aat tca tta tct gcc ttt acc cct gct ttg tca aac caa	724
aat gta gag gaa gag aag aga gga cct aag tca ata ttt gga agt tct	772
aat aat agc ttc agt agc ttc cct gta tca tct gcg gtt ttg ggc gaa	820
cct ttc cag gct agc aaa gca ggt gtc agg cag ggg tgt gaa gaa gct	868
gtt tcc cag gtg gaa cca ctt ccc agc cta atg aaa gga ctg aaa agg	916
aag gag gac cag gat cgc tcc cca agg aga cat ggc cac gag cca gca	964
gaa gat tcg gat cct ctg tcc cgg ggc gat cat cct cca gac aaa cga	1012
cct gtc cgc ctg aat cga ccc cgg gga ggt act tta ttt ggt cgg acg	1060

ata cag gat gtt ttc aaa agc aat aag gaa gta ggt cgt ctg ggc aac	1108
aag gag gcc aaa aag gaa act ggc ttt gtt gag tct gca gaa agt gac	1156
cac atg gct atc cca gga ggg aat cag tct gtc ctg gca cct tcc cgg	1204
att cca ggt gtg aat aaa gag gaa gaa act gaa agt aga gag aag aaa	1252
gaa gat tct cta aga gga act ccg gcg cgt cag agt aac aga agc gag	1300
agc aca gac agt ctt ggg ggc ttg tct ccc tct gaa gtc aca gcc atc	1348
cag tgc aag aac atc cct gac tac ctc aac gac agg acc att ctg gag	1396
aac cat ttt ggc aaa att gct aaa gtg cag cgc atc ttt acc agg cgc	1444
agc aaa aag ctt gca gtg gta cat ttc ttt gat cat gca tct gca gcc	1492
ctg gct aga aag aag ggg aaa agt ttg cat aaa gac atg gct atc ttt	1540
tgg cac agg aag aaa ata agc ccc aat aag aaa ccc ttt tcc ctg aag	1588
gag aag aaa cca ggt gac ggt gaa gtc agc ccg agc aca gag gat gca	1636
ccc ttt cag cac tct cct ctt ggc aag gcc gca ggg agg act ggt gct	1684
agc agc ctc ctg aat aaa agc tct cca gtg aag aag cca agt ctt cta	1732
aag gcc cac caa ttc gag gga gac tct ttt gac tca gcc tcc gag ggc	1780
tcc gag ggc ctc ggg cca tgt gtg ctc tcc ctc agt acc ctg ata ggc	1828
act gtg gct gag aca tcc aag gag aag tac cgc ctg ctt gac cag aga	1876
gac agg atc atg cgg caa gct cgg gtg aag aga acc gat ctg gac aaa	1924
gcg agg act ttt gtt ggc acc tgc ctg gat atg tgt cct gag aag gag	1972
agg tac atg cgg gag acc cgt agc cag ctg agc gtg ttc gaa gtg gtc	2020
cca ggg act gac cag gtg gac cac gca gca gct gtg aaa gag tac agt	2068
cgg tcc tcg gcg gat cag gag gag ccc ctg ccc cac gag ctg cgg ccc	2116
ttg cca gtg ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg acc cag atc atg	2164
gac cag aag gag ggc agc ctg cgg gat tgg tat gac ttc gtg tgg aac	2212
cgc acg cgt ggc ata cgg aag gat atc acg cag cag cac ctc tgt gac	2260
ccc ctg acg gtg tcc ctg att gag aag tgc acc cgg ttt cac atc cac	2308
tgt gcc cac ttc atg tgt gag gag ccc atg tcc tcc ttt gat gcc aag	2356

atc aat aat gag aac atg acc aag tgc ctg cag agc ctg aag gag atg	2404
tac cag gac ctg aga aac aag ggt gtc ttc tgt gcc agc gaa gcg gag	2452
ttc cag ggc tac aat gtt ctg ctc agt ctc aac aag gga gac atc cta	2500
aga gaa gta caa cag ttc cat cct gct gtt aga aac tca tct gag gtg	2548
aaa ttt gct gtt cag gct ttt gct gca ttg aac agt aat aat ttt gtg	2596
aga ttt ttc aaa ctg gtc cag tca gct tct tac ctg aac gct tgt ctt	2644
tta cac tgt tac ttc agt cag atc cgc aag gat gct ctc cgg gcg ctc	2692
aac ttt gcg tac acg gtg agc aca cag cga tct acc atc ttt ccc ctg	2740
gat ggt gtg gtg cgc atg ctg ctg ttc aga gac tgt gaa gag gcc acc	2788
gac ttc ctc acc tgc cac ggc ctc acc gtt tcc gac ggc tgt gtg gag	2836
ctg aac cgg tct gca ttc ctg gaa cca gag gga tta tcc aag acc agg	2884
aag tcg gtg ttt att act agg aag ctg acg gtg tca gtc ggg gaa att	2932
gtg aac gga ggg cca ttg ccc ccc gtc cct cgt cac acc cct gtg tgc	2980
agc ttc aac tcc cag aac aag tac atc ggg gag agc ctg gcc gcg gag	3028
ctg ccc gtc agc acc cag aga ccc ggc tcc gac aca gtg ggc gga ggg	3076
aga gga gag gag tgt ggt gta gag ccg gat gca ccc ctg tcc agt ctc	3124
cca cag tct cta cca gcc cct gcg ccc tca cca gtg cct ctg cct cct	3172
gtc ctg gca ctg acc ccg tct gtg gcg ccc agc ctc ttc cag ctg tct	3220
gtg cag cct gaa cca ccg cct cca gag ccc gtg ccc atg tac tct gac	3268
gag gac ctg gcg cag gtg gtg gac gag ctc atc cag gag gcc ctg cag	3316
agg gac tgt gag gaa gtt ggc tct gcg ggt gct gcc tac gca gct gcc	3364
gcc ctg ggt gtt tct aat gct gct atg gag gat ttg tta aca gct gca	3412
acc acg ggc att ttg agg cac att gca gct gaa gaa gtg tct aag gaa	3460
aga gag cga agg gag cag gag agg cag cgg gct gaa gag gaa agg ttg	3508
aaa caa gag aga gag ctg gtg tta agt gag ctg agc cag ggc ctg gcc	3556
gtg gag ctg atg gaa cgc gtg atg atg gag ttt gtg agg gaa acc acc	3604
tcc cag gag ttg aag aat gca gta gag aca gac cag agg gtc cgt gtg	3652

gcc cgt tgc tgt gag gat gtc tgt gcc cac tta gtg gac ttg ttt ctc	3700
gtg gag gaa atc ttc cag act gca aag gag acc ctc cag gag ctt cag	3748
tgc ttc tgc aag tat cta cag cgg tgg agg gaa gct gtc aca gcc cgc	3796
aag aaa ctg agg cgc caa atg cgg gct ttc cct gct gcg ccc tgc tgc	3844
gtg gac gtg agc gac cgg ctg agg gcg ctg gcg ccc agc gca gag tgc	3892
ccc att gct gaa gag aac ctg gcc agg ggc ctc ctg gac ctg ggc cat	3940
gca ggg aga ttg ggc atc tct tgc acc agg tta agg cgg ctc aga aac	3988
aag aca gct cac cag atg aag gtt cag cac ttc tac cag cag ctg ctg	4036
agt gat gtg gca tgg gcg tct ctg gac ctg cca tcc ctc gtg gct gag	4084
cac ctc cct ggg agg cag gag cat gtg ttt tgg aag ctg gtg ctg gtg	4132
ttg ccg gat gta gag gag cag tcc cca gag agt tgt ggc aga att cta	4180
gca aat tgg tta aaa gtc aag ttc atg gga gat gaa ggc tca gtg gat	4228
gac aca tcc agc gat gct ggt ggg att cag acg ctt tcg ctt ttc aac	4276
tca ctt agc agc aaa ggg gat cag atg att tct gtt aac gtg tgt ata	4324
aag gtg gcc cat ggc gcc ctc agt gat ggt gcc att gat gct gtg gag	4372
aca cag aag gac ctc ctg gga gcc agt ggg ctc atg ctg ctg ctt ccc	4420
ccc aaa atg aag agt gag gac atg gca gag gag gac gtg tac tgg ctg	4468
tcg gcc ttg ctg cag ctc aag cag ctc ctg cag gct aag ccc ttc cag	4516
cct gcg ctt cct ctg gtg gtt ctt gtg cct agc cca gga ggg gac gcc	4564
gtt gag aag gaa gta gaa gat ggt ctg atg cta cag gac ttg gtt tca	4612
gct aag ctg att tca gat tac act gtt acc gag atc cct gat acc att	4660
aat gat cta caa ggt tca act aag gtt ttg caa gca gtg cag tgg ctg	4708
gtt tcc cac tgc ccc cat tcc ctt gac ctc tgc tgc cag act ctc att	4756
cag tac gtc gaa gac ggg att ggc cat gag ttt agt ggc cgc ttt ttc	4804
cat gac aga aga gag agg cgt ctg ggc ggt ctt gct tct cag gag cct	4852
ggc gcc atc att gag ctg ttt aac agt gtg ctg cag ttc ctg gct tct	4900
gtg gtg tcc tct gaa cag ctg tgt gac ctg tcc tgg cct gtc act gag	4948

ttt gct gag gca ggg ggc agc cgg ctg ctt cct cac ctg cac tgg aat 4996
gcc cca gag cac ctg gcc tgg ctg aag cag gct gtg ctc ggg ttc cag 5044
ctt ccg cag atg gac ctt cca ccc ctg ggg gcc ccc tgg ctc ccc gtg 5092
tgc tcc atg gtt gtc cag tac gcc tcc cag atc ccc agc tca cgc cag 5140
aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gtg gag aac ctg ctc cac aga acc 5188
tac tgt agg tgg aag agc aag agt ccc tcc cca gtc cat ggg gca ggc 5236
ccc tcg gtc atg gag atc cca tgg gat gat ctt atc gcc ttg tgt atc 5284
aac cac aag ctg aga gac tgg acg ccc ccc cgg ctt cct gtt aca tca 5332
gag gcg ctg agt gaa gat ggt cag ata tgt gtg tat ttt ttt aaa aac 5380
gat ttg aaa aaa tat gat gtt cct ttg tcg tgg gaa caa gcc agg ttg 5428
cag acg cag aag gag cta cag ctg aga gag gga cgt ttg gca ata aag 5476
cct ttt cat cct tct gca aac aat ttt ccc ata cca ttg ctt cac atg 5524
cac cgt aac tgg aag agg agc aca gag tgt gct caa gag ggg agg att 5572
ccc agc aca gag gat ctg atg cga gga gct tct gct gag gag ctc ttg 5620
gcg cag tgt ttg tcg agc agt ctg ctg ctg gag aaa gaa gag aac aag 5668
agg ttt gaa gat cag ctt cag caa tgg ttg tct gaa gac tca gga gca 5716
ttt acg gat tta act tcc ctt ccc ctc tat ctt cct cag act cta gtg 5764
tct ctt tct cac act att gaa cct gtg atg aaa aca tct gta act act 5812
agc cca cag agt gac atg atg agg gag caa ctg cag ctg tca gag gcg 5860
aca gga acg tgt cta ggc gaa cga cta aag cac ctg gaa agg ctg atc 5908
cgg agt tca agg gaa gag gaa gtt gcc tct gag ctc cat ctc tct gcg 5956
ctg cta gac atg gtg gac att tga gcagcctgac ctgtggggag ggggtctctc 6010
ccgaagagtt tctgtttta ctcaaaaataa tgttattctc agatgcttga tgcactgttg 6070
gaaaatgtgat taatttaatc atgcagataa accatttaaa tgtc 6114

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 5

ccgtgggatg acatcatcac 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 6

catgtccacc atctccagca 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 7

tttgtctgga ggatgatcgc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 8

aaagagaaaag gggccaggcc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 9

ccagttctt gtccaaaagc 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁶ C12N15/57, C12N9/64, C12P21/08, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁶ C12N15/57, C12N9/64, C12P21/08, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Geneseq**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Thomas C., et al., "M17: a novel gene expressed in germinal centers", International Immunology (1994), Vol. 6, No. 8, p.1203-1211	1-9
A	Ming-Jie Li, et al., "Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93, No. 19, p.10222-10227	1-9
A	Frank C., et al., "Augmented expression of a human gene for 8-oxoguanine DNA glycosylase in B lymphocytes of the dark zone in lymph node germinal centers", J. Exp. Med. (1997), Vol. 186, No. 9, p.1547-1556	1-9
A	Masaki Hikida, et al., "Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p.2092-2094	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 October, 1999 (27. 10. 99)	Date of mailing of the international search report 9 November, 1999 (09. 11. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04634

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shuhua H., et al., "Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p.2094-2097	1-9
A	Kazuhiko Kuwahara, et al., "Identification of a 52-kDa molecule coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate", J. Immunol. (1994), Vol. 152, p.2742-2752	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04634

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/57, C12N 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/57, C12N 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Thomas C., et al. "M17: a novel gene expressed in germinal centers", International Immunology(1994), Vol. 6, No. 8, p. 1203-1211	1-9
A	Ming-Jie Li, et al. "Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996), Vol. 93, No. 19, p. 10222-10227	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27. 10. 99	国際調査報告の発送日 09.11.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 富永 みどり 印 4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Frank C., et al. "Augmented expression of a human gene for 8-oxoguanine DNA glycosylase in B lymphocytes of the dark zone in lymph node germinal centers", J. Exp. Med. (1997), Vol. 186, No. 9, p. 1547-1556	1-9
A	Masaki Hikida, et al. "Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p. 2092-2094	1-9
A	Shuhua H., et al. "Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p. 2094-2097	1-9
A	Kazuhiko Kuwahara, et al. "Identification of a 52-kDa molecule coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate", J. Immunol. (1994), Vol. 152, p. 2742-2752	1-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.